

**Streßreaktionen und Streßbewältigungsstrategien von Buche
(*Fagus sylvatica* L.), Birke (*Betula pendula* Roth.) und Eberesche
(*Sorbus aucuparia* L.) unter verschiedenen abiotischen und
biotischen Belastungssituationen**

—

Der Beitrag apoplastischer Peroxidasen der Blätter

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften,
Landschaftsarchitektur

an der

Universität Essen

vorgelegt von

Angela Wobus

aus Zwickau

Juni 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Forstbotanik und Forstzoologie der TU Dresden durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Pfanz

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Ludwig-Müller, TU Dresden

3. Gutachter: Prof. Dr. G.-B. Feige

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. W. Kuttler

Tag der mündlichen Prüfung: 11. 12. 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung und Gegenstand der Untersuchungen	2
1.2	Schwefeldioxid	4
1.3	Ozon	5
1.4	Peroxidasen	7
2	Zielstellung	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Pflanzenmaterial und Versuchsaufbau	10
3.1.1	Immissionsstreß-Versuche	10
3.1.2	Untersuchungen zum Einfluß weiterer biotischer und abiotischer Stressoren	13
3.1.3	Untersuchungen an einer adulten Buche	16
3.2	Probenahmen	16
3.3	Bestimmung des Chlorophyll- und Wassergehaltes der Blätter	17
3.4	Bestimmung des Interzellularraum-Volumens	17
3.5	Gewinnung der Interzellulären Waschflüssigkeit (IWF)	18
3.6	Bestimmung der Peroxidaseaktivität in der IWF	19
3.6.1	Messung der Sulfitoxidationsraten	19
3.6.2	IAA-Oxidation	20
3.7	Proteinbestimmung	22
3.8	Auftrennung der Peroxidase-Isoformen mittels Isoelektrischer Fokussierung	23
3.9	Einflußfaktoren auf die enzymatischen Eigenschaften der Zellwand-Peroxidasen	23
3.9.1	Untersuchungen zur Zusammensetzung und Einwirkungszeit der Infiltrationslösung	24
3.9.2	Temperaturstabilität der Peroxidasen	25
3.9.3	Abhängigkeit der Sulfitoxidation vom pH-Wert	25
3.9.4	Einfluß von Ascorbat auf die Sulfitoxidationsraten	25
3.10	Weitere Charakterisierung des Pflanzenmaterials aus dem Immissionsstreß-Versuch	26
3.10.1	Blattflächenmessung	26
3.10.2	Bestimmung der pH-Werte und Pufferkapazitäten von Blatthomogenaten	26
3.10.3	Elementgehalte der Blätter	26
3.10.4	Abschluß des Immissionsstreß-Versuches - Bestimmung verschiedener Wachstumsparameter	26
3.11	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	27
3.12	Statistische Auswertung	27

4	Ergebnisse und Diskussion	28
4.1	Der Apoplast	28
4.1.1	Der Interzellularraum	28
4.1.2	Die Zellwand	31
4.1.3	Interzelluläre Waschflüssigkeit	33
4.1.4	Zusammenfassung	35
4.2	Grundlegende Untersuchungen zur Peroxidaseaktivität im Apoplasten	36
4.2.1	Methodenoptimierung für die <i>in vitro</i> -Messungen - Optimale Substratkonzentrationen bei der Sulfitoxidation	36
4.2.2	Methodenoptimierung für die <i>in vitro</i> -Messungen - Optimale Substratkonzentrationen bei der IAA-Oxidation	37
4.2.3	Zusammensetzung, pH-Wert und Einwirkungszeit der Infiltrationslösung	38
4.2.4	Thermische Stabilität der Peroxidasen	47
4.2.5	Abhängigkeit der enzymatischen Reaktionen vom pH-Wert	48
4.2.6	Einfluß von Ascorbat auf die Umsatzraten der Peroxidasen	51
4.2.7	Zusammenfassung	53
4.3	Immissionsstreß-Versuche	54
4.3.1	Schadsymptome der Blätter	54
4.3.2	Blattflächen und Trockensubstanzgehalt	64
4.3.3	Interzellularraum-Volumen unter Immissionsbelastung	65
4.3.4	Wuchsparameter	68
4.3.5	Chlorophyllgehalt	75
4.3.6	pH-Werte und Pufferkapazitäten der Blatthomogenate	79
4.3.7	Elementgehalte der Blätter	82
4.3.8	Zusammenfassung	87
4.3.9	Peroxidaseaktivität	88
4.3.10	Isoelektrische Fokussierung der Peroxidase-Isoformen	99
4.3.11	Proteingehalt der IWF unter Immissionsbelastung	105
4.3.12	Zusammenfassung	106
4.4	Untersuchungen an <i>Fagus sylvatica</i> L. zu weiteren abiotischen und biotischen Streßfaktoren	108
4.4.1	Einfluß von Blattverwundungen auf die Zellwand-Peroxidasen von Buchen-Jungpflanzen	108
4.4.2	Untersuchungen zu den Auswirkungen des Befalls mit <i>Phyllaphis fagi</i>	111
4.4.3	Einfluß von Trockenstreß auf Buchen-Jungpflanzen	117
4.4.4	Zusammenfassung	124

5	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse und Schlußfolgerungen	125
6	Literaturverzeichnis	129

1 Einleitung

Die dünne Lufthülle der Erde muß aufgrund der hohen Menge und Ausbreitungsgeschwindigkeit von Stoffeinträgen und ihrer durchaus begrenzten Erneuerungsfähigkeit als besonders sensibler Bereich der Umwelt betrachtet werden. Doch ist es gerade die Atmosphäre, die durch Abfallprodukte menschlicher Aktivitäten wie bodennahes Ozon, Stickstoffverbindungen, halogenierte Kohlenwasserstoffe, Schwefeldioxid und Photooxidantien oder Aerosole und Stäube nachhaltig belastet wird.

Die Tabelle 1 enthält Angaben über einige anthropogene Umweltbelastungen und deren Konzentration sowie ihre durchschnittliche Verweilzeit in der Atmosphäre.

Tabelle 1: Konzentrationen und Verweilzeiten von Luftverunreinigungen in der Atmosphäre. Nach LARCHER [1994], gekürzt.

Chemische Verbindung	Typische Konzentration [ppm] in sauberer Luft	Typische Konzentration [ppm] in verunreinigter Luft	Durchschnittliche Verweilzeit in der Atmosphäre
CO	0,1	40 - 70	2 - 6 Monate
SO ₂	0,0002	0,2	1 - 10 Tage
O ₃	0,02	0,5	Tage - Monate
NO	< 0,002	1 - 2	3 - 6 Tage

Pflanzen nehmen diese Luftschadstoffe durch den lebensnotwendigen Gasaustausch mit der Atmosphäre auf. Eine Störung der normalen Lebensfunktionen ist häufig die Folge. Wie stark die Lebensfunktionen der Pflanzen durch Luftschadstoffe beeinträchtigt werden, hängt von sehr vielen Faktoren ab. Dazu gehören beispielsweise die Konzentration des Schadstoffes, der Zeitpunkt und die Dauer seiner Einwirkung sowie dessen Chemismus. Auch das Alter der Pflanze und deren Aktivitäts- und Gesundheitszustand spielen eine sehr wichtige Rolle. Die standörtlichen Klima- und Bodenverhältnisse dürfen ebenfalls nicht vernachlässigt werden.

Eine enge Korrelation zwischen der Konzentration des Schadstoffes, seiner Einwirkungsdauer und der Schädigung auf die Pflanze besteht meist nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich. Liegen die Schadstoffkonzentrationen unterhalb eines Schwellenwertes, so tritt auch bei längerer Einwirkung keine Schädigung auf, wohingegen eine sehr hohe Konzentration auch bei kurzer Einwirkungszeit bereits deutliche Schäden hervorrufen kann [HEBER et al., 1987; LARCHER, 1994]. Treten mehrere Schadfaktoren gleichzeitig auf, wie dies im Freiland häufig der Fall ist, erschweren synergistische oder auch antagonistische Effekte eine Aufklärung der Schädigungsmechanismen. Bei Untersuchungen an Bäumen kommt hinzu, daß sich diese Prozesse oft über lange Zeiträume erstrecken, so daß Schädigungssymptome, die zu einem bestimmten Zeitpunkt beobachtet werden, nicht nur durch die gleichzeitige Einwirkung verschiedener Faktoren, sondern auch durch deren zeitliche Abfolge verursacht sein können.

Angesichts solch komplexer Vorgänge ist es nicht verwunderlich, daß Begriffe wie „Waldsterben“ oder „Neuartige Waldschäden“, die vor allem in der Vergangenheit häufig als

Sammelbezeichnungen für weiträumig auftretende Krankheitssymptome der Wälder fungierten, nur begrenzt mit allgemeingültigen und hinreichend schlüssigen Fakten zu deren Ursachen untermauert werden konnten. Seit einiger Zeit werden daher verstärkt Untersuchungsmethoden diskutiert, die eine differenziertere Sichtweise auf die Waldschadensproblematik ermöglichen und die jeweiligen regionalspezifischen Einflußfaktoren auf die Vitalität der Pflanzen sowie die Entwicklungstendenzen innerhalb eines größeren Zeitraumes stärker berücksichtigen [ELLING, 1992; ELLENBERG, 1995].

Ungeachtet jahrelanger Forschungsbemühungen sind auch die vielfältigen Wirkungen der Schadstoffe in den Pflanzen selbst noch nicht vollständig aufgeklärt.

Untersuchungen unter definierten Umweltbedingungen mit bekannten, an die Freilandverhältnisse angepaßten Schadstoffkonzentrationen sowie einer Kombination von wenigen Schadfaktoren können zum Erkenntnisgewinn über die Reaktionen von Bäumen auf bestimmte Schadstoffe beitragen, da sie den experimentellen Zugang zu dieser Problematik erleichtern. Dies bietet sich insbesondere bei physiologischen und biochemischen Untersuchungen an, da hier häufig Veränderungen beobachtet werden können, die bereits vor dem Auftreten äußerlicher Schadsymptome in den Pflanzen ablaufen.

Die jahrzehntelange Konzentration der Ursachenforschung auf die wirtschaftlich wichtigste Waldbaumart Fichte hat nach dem Beginn der Umgestaltung vieler Wirtschaftswälder von Monokulturen zu Mischwaldgesellschaften mit Laubbaumanteil zu einem erhöhten Forschungsbedarf im Bereich der Laubbaumarten geführt. Dies gilt umso mehr, nachdem festgestellt wurde, daß Laubbäume deutlich anders reagieren als Nadelbäume und im Gegensatz zu diesen auch nach dem gebietsweisen Rückgang der Konzentrationen einiger Schadstoffe häufig keine Erholungstendenzen zeigen [ELLING, 1992; MATYSSEK und INNES, 1999]. Die hier durchgeführten Untersuchungen widmeten sich daher speziell den Reaktionsmustern von Laubbäumen unter Schadstoffbelastung.

1.1 Problemstellung und Gegenstand der Untersuchungen

Die vorliegende Arbeit steht in engem Kontext zum ökologisch orientierten Waldumbau im Osterzgebirge. Diese Region ist bereits seit mehr als 100 Jahren SO_2 -Einträgen und zunehmend auch pflanzenphysiologisch relevanten O_3 -Immissionen ausgesetzt.

Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die mittleren und maximalen SO_2 - und Ozon-Belastungen im Jahr 1997 an je einem Standort der unteren (Tharandt) und der höheren Lagen (Oberbärenburg) des Osterzgebirges.

Tabelle 2: Jahresmittelwerte und maximale Tagesmittelwerte an zwei Standorten der Region Osterzgebirge im Jahr 1997 [Quelle: ZIMMERMANN et al., 1998]

Standort	Jahresmittelwerte [$\mu\text{g} / \text{m}^3$]		maximale Tagesmittelwerte [$\mu\text{g} / \text{m}^3$]	
	SO ₂	O ₃	SO ₂	O ₃
Tharandt (untere Lagen, 380 m ü. NN)	24	46	163	82
Oberbärenburg (höhere Lagen, 745 m ü. NN)	26	70	191	160

Die chronische SO₂-Belastung ist vor allem aufgrund von Sanierungsmaßnahmen bei Kraftwerken auf der tschechischen Seite des Erzgebirges in der Tendenz rückläufig, während die Ozonbelastung zunimmt [ZIMMERMANN et al., 1998].

Insbesondere seit Anfang der 80er Jahre zeigten sich aufgrund der Immissionssituation in allen Höhenlagen des Osterzgebirges starke Waldschäden, die zum Teil zum großflächigen Absterben der hier vorrangig angebauten Fichtenmonokulturen führten [NEBE und VOGEL, 1998].

Aus der Notwendigkeit heraus, auf diesen Flächen stabilere Mischwaldgesellschaften aufzubauen, sind die ursprünglich in der Region vorkommenden Baumarten wieder mehr in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Die ursprüngliche Bestockung wurde neben der Fichte aus Tanne, Buche und Bergahorn sowie Eberesche, Birke, Aspe, Erle und einigen Wildobstarten gebildet [HEMPEL, 1983]. Die Überlebensstrategien dieser Baumarten unter den in dieser Region herrschenden schwierigen Umweltbedingungen zu untersuchen, ist damit zu einer aktuellen Aufgabe geworden.

Die vorliegende Studie konzentriert sich auf die regional besonders wichtigen Baumarten Buche, Birke und Eberesche.

Die Eberesche (*Sorbus aucuparia* L.) und die Hängebirke (*Betula pendula* Roth.), spielen aufgrund ihrer geringen Ansprüche an den Boden, ihrer Widerstandsfähigkeit gegen tiefe Temperaturen und ihrer Fähigkeit, sich auf Waldböden nach Kahlschlag leicht zu vermehren eine bedeutende Rolle in den Initialstadien der Sukzession auf Kahlflächen [INSTITUT FÜR WALDBAU GÖTTINGEN, 1992]. Beide Baumarten sind raschwüchsig, fruktifizieren stark und gehören im Erzgebirge zu den wichtigsten Wegbereitern für neue Waldgesellschaften auf den geschädigten Flächen. Sie haben dabei nicht nur eine Schutzfunktion für im Jugendstadium weniger robuste, langsamer wachsende Baumarten, sondern tragen auch erheblich zur Bodenverbesserung auf diesen Flächen bei.

Die Rot-Buche (*Fagus sylvatica* L.) wird vor allem in den niederen und mittleren Lagen des Erzgebirges als ökologisch und auch wirtschaftlich wertvolle Baumart waldbaulich gefördert. Sie ist ebenfalls im Jugendstadium raschwüchsig. Die Buche gilt als „plastische“, stark auf veränderliche Umweltbedingungen reagierende Baumart [INSTITUT FÜR WALDBAU GÖTTINGEN, 1992].

Hauptgegenstand der Untersuchung war das Verhalten von Jungpflanzen dieser drei Baumarten unter definierter Langzeitbelastung mit den Luftschadstoffen SO₂ und O₃. Hierbei wurde Schwefeldioxid als alleiniger Streßfaktor und in Kombination mit Ozon untersucht.

Im Falle der Rot-Buche, wurden zudem die Auswirkungen weiterer, im Bereich des Erzgebirges relevanter, biotischer und abiotischer Stressoren wie Blattverwundung, Blattlausbefall und Trockenheit verfolgt. Zu den untersuchten Parametern gehörten sowohl physiologische, als auch morphologische und anatomische Merkmale der Pflanzen.

Von speziellem Interesse war dabei die Frage, ob unter diesen Bedingungen bereits in den Zellwänden der Blätter Veränderungen stattfinden und ob diese für eine mögliche Streßabwehr von Bedeutung sind.

Die Zellwand enthält aufgrund ihrer fibrillären Struktur zahlreiche Hohlräume und besitzt eine große Oberfläche. Durch diese Eigenschaften spielt sie eine große Rolle bei der Adsorption gelöster Schadstoffe und viele initiale Prozesse der Auseinandersetzung mit diesen Stoffen laufen schon im extrazellulären Raum ab [HOCK, 1995, TAMÁS et al., 1997]. An diesen Prozessen sind wahrscheinlich auch verschiedene Enzyme beteiligt. Anhand der apoplastischen Peroxidasen sollte dies genauer untersucht werden. Die Peroxidasen sind im Bereich der Zellwand von zentraler Bedeutung, da sie in mehrere grundlegende physiologische Abläufe integriert sind.

Die folgenden drei Abschnitte sollen einen kurzen theoretischen Überblick über die beiden untersuchten Luftschadstoffe und die Enzymgruppe der Peroxidasen geben.

1.2 Schwefeldioxid

Schwefeldioxid ist das Schadgas, das am häufigsten Schäden an Pflanzen verursacht. Es stammt zum größten Teil aus der Verbrennung schwefelhaltiger Brennstoffe. Zu geringen Teilen ist es mikrobieller Herkunft oder das Ergebnis vulkanischer Aktivitäten. Es gelangt als gasförmiger Bestandteil der Luft auf dem gleichen Wege wie das Kohlendioxid und ebenso leicht wie dieses über die geöffneten Spaltöffnungen in die Pflanzen, überwindet aber, im Gegensatz zu CO₂, auch bei geschlossenen Spaltöffnungen den cuticulären Widerstand [RENNENBERG, 1984; LARCHER, 1994]. Die Haupteintrittspforten für SO₂ stellen jedoch die Spaltöffnungen dar. Neben der Öffnungsweite der Spaltöffnungen haben vor allem Luftbewegungen, die zur Verminderung des Diffusionswiderstandes an der Grenzschicht zwischen Luft und Blattoberfläche führen, sowie der Grad der Befeuchtung der Blattoberfläche und deren Beschaffenheit einen Einfluß auf die Aufnahme von SO₂ durch die Blätter.

In den Blättern wird das SO₂ über das Interzellularensystem an die wäßrige Phase des Apoplasten herantransportiert, wo es aufgrund seiner hohen Löslichkeit rasch aufgenommen wird. Es stellt sich ein Fließgleichgewicht zwischen der Gasphase in den Interzellularen, der Wasserphase des Apoplasten und, nach Überwindung der Plasmamembran, der cytosolischen Phase der Zellen ein. Die Lösung des Schwefeldioxids in wäßrigen Phasen erfolgt gemäß Gleichung 1:



Im sauren pH-Bereich ist HSO₃⁻ die dominierende Verbindung, während im alkalischen Milieu SO₃²⁻ überwiegt [HEBER et al. 1987; PFANZ et al. 1987]. Ein weiteres rasch entstehendes Folgeprodukt ist SO₄²⁻.

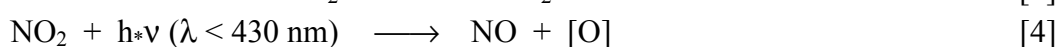
Nach PFANZ et al. [1987] fließt bei belichteten Blatt-Mesophyllzellen der bei weitem höchste Anteil des aufgenommenen Schwefeldioxids (bzw. seiner Folgeprodukte) den Chloroplasten zu (96%), da diese mit einem pH-Wert von etwa 8 das alkalischste Kompartiment der Zelle darstellen und somit als Ionenfalle fungieren. Das Schwefeldioxid schädigt die Zellen also bevorzugt in einem besonders sensitiven Kompartiment, am Ort der Photosynthese. Daraus ergibt sich auch, daß zu den ersten meßbaren Schädigungssymptomen unter dem Einfluß von Schwefeldioxid eine verminderte photosynthetische Leistung der Blätter zählt. Die biochemischen Ursachen hierfür sind vielfältig, deshalb sollen an dieser Stelle lediglich einige genannt werden, die direkt in den Prozeß der Photosynthese eingreifen. Dazu gehören unter anderem eine Beeinflussung der Sauerstoffbildung und des Elektronentransports, die Entkopplung der Photophosphorylierung und eine Hemmung der Ribulosebisdiphosphat-Carboxylase/ Oxygenase sowie die Destabilisierung der Membranintegrität [HÄLLGREN, 1978; HEATH, 1980; JÄGER und KLEIN, 1980].

Aber auch andere Bereiche des zellulären Metabolismus werden durch SO₂ beeinträchtigt, wobei insbesondere pH-Wert-Verschiebungen, osmotische Imbalancen und veränderte enzymatische Aktivitäten eine Rolle spielen [HEATH 1980; PFANZ und HEBER, 1985; SCHLEE, 1992].

Zu den charakteristischen, äußerlich sichtbaren Schadsymptomen unter SO₂-Einfluß gehören Chlorosen der Blätter. Hierbei spielen vordergründig die oxidierten Folgeprodukte des SO₂ in den Zellen eine Rolle. Bei der Reaktion von Bisulfit mit Superoxid (O₂⁻) kann sich das reaktive Bisulfit-Radikal (HSO₃[•]) bilden, das durch die Induktion einer Radikalkettenreaktion eine Lipidperoxidation bewirkt, die mit einer Pigmentoxidation einher geht. Weitere äußerlich sichtbare Schadsymptome können Verbräunungen von Blattspitzen und Blatträndern, das Absterben einzelner Organe, bzw. die verfrüht einsetzende Blattabszission sein [PEISER und YANG, 1977; ELSTNER und HIPPELI, 1995].

1.3 Ozon

Die Ozonbelastung der Luft wird häufig als Bestandteil des sogenannten „photochemischen Smogs“ und als „sekundäre“ Luftverschmutzung bezeichnet, da Ozon in der Troposphäre vorwiegend durch photochemische Reaktionen aus Stickoxiden gebildet wird. Vor allem Autoabgase und die Emissionen der chemischen Industrie setzen Stickstoffmonoxid und Stickstoffdioxid frei, die als Vorläufersubstanzen für die Ozonbildung fungieren. Bei Verbrennungsprozessen kommt es vor allem zur Bildung von NO, das in der Atmosphäre mit Sauerstoff zu NO₂ reagiert (Gleichungen 2 und 3). Unter Belichtung zerfällt NO₂ wiederum zu NO und atomarem Sauerstoff (Gleichung 4), der dann mit Luftsauerstoff Ozon bildet (Gleichung 5) [ELSTNER und HIPPELI, 1995].



Das gebildete Ozon ist ein sehr reaktives Molekül und unterliegt aus diesem Grunde zahlreichen Folgereaktionen. Bei der Photolyse von Ozon entsteht beispielsweise wiederum aktivierter Sauerstoff, der mit Kohlenmonoxid oder organischen Verbindungen weiteres Ozon

bilden kann, oder mit Wasser reagiert und aggressive Hydroxylradikale (HO^\bullet) bildet. Bei Vorhandensein ungesättigter Kohlenwasserstoffe entstehen organische Peroxide, unter denen das Peroxyacetylnitrat als wichtigste Verbindung zu nennen wäre [ELSTNER und HIPPELI, 1995; STOCKWELL et al., 1997]. Aufgrund ihrer Abhängigkeit vom Sonnenlicht zeigen die Photooxidantien eine ausgeprägte tageszeitliche, jahreszeitliche und witterungsabhängige Konzentrationsdynamik [LARCHER, 1994].

Ozon wird von den Pflanzen über die Spaltöffnungen aufgenommen, die Cuticula ist nahezu impermeabel für diesen Schadstoff [KERSTIENS und LENDZIAN, 1989]. Die aufgenommene Menge hängt hierbei von den gleichen physikalischen, chemischen und blattanatomischen Gegebenheiten ab, die für SO_2 Gültigkeit haben. Ozon diffundiert in den Interzellularraum und bildet bei Kontakt mit den Zellwänden aufgrund seiner hohen Reaktivität sehr rasch Verbindungen wie beispielsweise Hydroxyl- und Superoxid-Anion-Radikale oder Wasserstoffperoxid [HEATH und TAYLOR, 1997; PELL et al., 1997; SCHRAUDNER et al. 1997]. Die Ozonkonzentration in der Gasphase des Interzellularraumes liegt aus diesem Grunde nahe Null [LAISK et al., 1989]. Die Folgeprodukte des Ozons sind ebenfalls zum größten Teil extrem reaktiv und stehen somit am Beginn der verschiedensten Reaktionssequenzen. Das Verständnis dieser komplexen Vorgänge ist jedoch derzeit noch lückenhaft [HEATH und TAYLOR, 1997].

Über die pflanzentoxischen Wirkungen von Ozon wurden in der Vergangenheit zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die ein breites Spektrum an biochemischen und physiologischen Effekten aufzeigten. Aus dem Chemismus des Ozons ergibt sich, daß weniger die Permeation durch die Zellwand und die Plasmamembran hindurch eine Rolle spielt, als vielmehr die Reaktion des Schadstoffs mit diesen beiden Komponenten und die daraus entstehenden Folgeprodukte und Signale für die Zelle [HEATH, 1980]. Eine Schädigung der Membranintegrität und damit die Verminderung der Fluidität, Semipermeabilität und Selektivität der Membranen gehört zu den wichtigsten Ozonwirkungen [SCHMIEDEN und WILD, 1995; PELL et al., 1997]. Mögliche Ursachen werden im Angriff auf die Membranproteine und in der Reaktion mit ungesättigten Fettsäuren gesehen [ELSTNER und HIPPELI, 1995; HEATH und TAYLOR, 1997]. Hieraus ergeben sich beispielsweise Imbalancen in der Ionenverteilung, ein veränderter zellulärer Wasserstatus und letztendlich auch Signalketten, die in komplexe metabolische Umstellungen der Zelle münden. Weiterführende Aussagen hierzu finden sich bei SANDERMANN [1996] sowie bei HEATH und TAYLOR [1997], LANGEBARTELS et al. [1997] und bei SCHRAUDNER et al. [1997].

Zu den makroskopisch erkennbaren Ozonschäden gehören neben der Ausbildung von sogenannten „Wasserflecken“ kleinflächige, oft bronzefarbene Blattnekrosen und Chlorosen. Eine verfrüht einsetzende Seneszenz der Blätter und ein verändertes Wuchsverhalten wurden ebenfalls beschrieben [MATYSSEK et al., 1995; KRAUSE und HÖCKEL, 1995; BUNGENER et al., 1999].

Sowohl Ozon- als auch SO_2 -Effekte sind schwer von den Auswirkungen anderer Stressoren (z.B. Pilz- oder Insektenbefall, Wasser- oder Nährstoffmangel, Temperaturstreß etc.) oder vom Beginn natürlicher Seneszenzprozesse abzugrenzen.

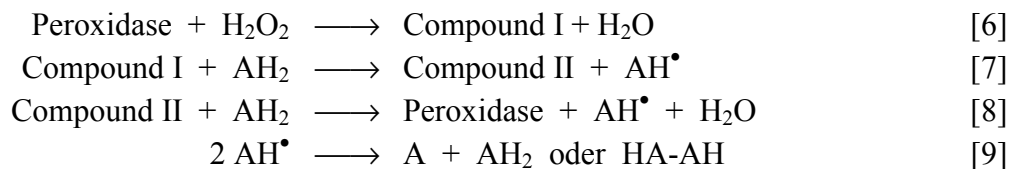
1.4 Peroxidasen

Die Enzymgruppe der Peroxidasen (Donor: H_2O_2 , Oxidoreduktase, EC. 1.11.1.7.) ist sowohl bei Pflanzen, als auch bei Tieren und Pilzen weit verbreitet. Sie zeichnet sich durch eine sehr hohe Zahl multipler Enzymformen und durch eine außerordentliche Spannbreite der Substrate aus [GASPAR et al., 1982; REPKA et al., 1996]. Pflanzliche Peroxidasen sind in der Regel glycosylierte Proteine mit einer prosthetischen Häm-Gruppe. Die im Molekül enthaltenen Calciumionen tragen zur Stabilisierung intramolekularer Peptidbindungen um das aktive Zentrum bei und sind deshalb von großer Bedeutung für die Funktion dieser Enzyme [WELINDER, 1985; VAN HUYSTEE und ESNAULT, 1992].

Der Apoprotein-Anteil der Peroxidasen wird am rER synthetisiert, während der Häm-Anteil in den Mitochondrien gebildet wird [VAN HUYSTEE, 1987]. Die Glycosylierung wird bei der Passage durch den Golgi-Apparat hinzugefügt. Wahrscheinlich werden die apoplastischen Enzymformen danach in Golgi-Vesikeln zur Plasmamembran transportiert und calciumvermittelt sekretiert [STICHER, 1981; PENEL, 1986].

Der Anteil der Peroxidaseproteine an der gesamten Proteinbiosynthese wird für Erdnußblätter mit 0,2% angegeben, in Zellkulturen kann dieser Wert um das Zehnfache gesteigert sein [VAN HUYSTEE, 1987 und 1990].

Peroxidasen katalysieren Reaktionen mit charakteristischen Ein-Elektron-Übertragungsschritten, wobei photometrisch meßbare Enzymintermediate entstehen ("Compound I und II"). Für die Reaktionen werden folgende allgemeine Gleichungen postuliert (Gleichungen 6 - 9):



AH_2 ist dabei der Wasserstoffdonor (z.B. eine phenolische Verbindung), AH^\bullet das freie radikalische Zwischenprodukt und A das oxidierte Produkt [YAMAZAKI et al., 1960; GASPAR et al., 1982; WELINDER, 1992].

Im Falle des radikalischen Zwischenproduktes bestehen jeweils in Abhängigkeit von seiner chemischen Natur und den gegebenen Bedingungen verschiedene Reaktionsmöglichkeiten: Es kann dimerisieren, mit anderen Substratmolekülen reagieren, andere Moleküle angreifen und Kooxidationsreaktionen initiieren, molekularen Sauerstoff zu Superoxid reduzieren, oder ein Peroxylradikal bilden [DUNFORD, 1991].

Im Apoplasten kommen die Peroxidasen als lösliche oder ionisch bzw. kovalent an die Zellwand gebundene Formen vor [MÄDER, 1992; BEUF et al., 1999]. Dort sind diese Enzyme nach derzeitigem Erkenntnisstand vor allem an Reaktionen beteiligt, die der Festigung der Zellwand und damit auch der Steuerung des Zellwachstums dienen. Sie katalysieren die Bildung von Diferulatbrücken zwischen Zellwandpolysacchariden [MCDUGALL, 1992] und die Bildung von Isodityrosin-Brücken zwischen Zellwandproteinen [FRY, 1982; BRETT und WALDRON, 1996]. Bei lignifizierenden Zellwänden initiieren sie die Polymerisation der Monolignole, wobei sie auch an der Biogenese des hierfür notwendigen Wasserstoffperoxids beteiligt sind [BOUDET et al., 1995; LAUKKANEN et al., 1999]. Sie sind Bestandteil von Suberinisierungsprozessen [CARPIN et al., 1999] und vermitteln die Verknüpfung von

Proteinen und anderen Molekülen mit Zellwandmaterial [WHITMORE, 1978; CASTILLO, 1986]. Auch bei der Stabilisierung der Zellmembran spielen sie möglicherweise eine Rolle, indem sie Brücken zwischen Tyrosin-Resten von Membranproteinen bilden [CASTILLO, 1986]. Außerdem sind Peroxidasen durch Oxidation von Indol-3-Essigsäure (IAA) zu 3-Methylenoxindol bzw. Indol-3-aldehyd in den Abbau dieses Phytohormones involviert und auf diesem Wege auch an der hormonellen Steuerung von Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt [GASPAR et al.; 1982; MCDUGALL, 1992; PFANZ, 1993].

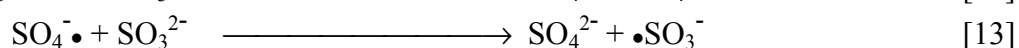
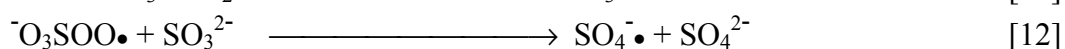
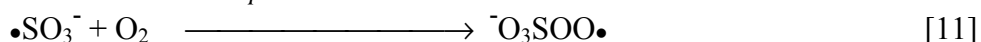
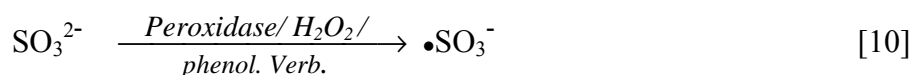
Bei der Suche nach geeigneten Frühindikatoren für Streß wurden Peroxidasen immer wieder als biochemische Parameter herangezogen, da sich Veränderungen der Enzymaktivität oft im verhältnismäßig kurzen Zeitraum von Stunden nach dem Eintreten eines Streßereignisses vollziehen [LAGRIMINI und ROTHSTEIN, 1987; DIEHN, 1993]. Teilweise wurde auch eine Korrelation der Peroxidaseaktivität mit der einwirkenden Schadstoffmenge festgestellt [z.B. KELLER, 1974; VAN ASSCHE et al., 1988]. Mit zunehmender Zahl der Studien über Peroxidasen wurden allerdings immer mehr Faktoren bekannt, die die Enzymaktivität beeinflussen, so daß keine einfachen Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge vorausgesetzt werden können.

Dennoch bleiben die Peroxidasen als Streßanzeiger interessant, da es sich um relativ leicht erfaßbare Parameter handelt. Sie sind eindeutig in pflanzliche Abwehrprozesse integriert [LAGRIMINI und ROTHSTEIN, 1987; MEHLHORN et al., 1987] und können zeitlich weit vor dem Auftreten makroskopisch erkennbarer Schadsymptome Informationen über eine eingetretene Streßreaktion liefern [KELLER, 1974; MANES et al., 1986].

Im Rahmen der vorliegenden Studie lag die Betrachtung der Peroxidasen nahe, da sowohl Ozon als auch Schwefeldioxid Radikalkettenreaktionen initiieren können und Peroxidasen neben Aminoxidasen, Katalasen und Superoxid-Dismutase als Bestandteil des intrazellulären antioxidativen Systems der Zellen eine wichtige Rolle beim Schutz vor toxischen Oxidantien spielen. Die Peroxidasen des Apoplasten sollen zudem nach CASTILLO et al. [1992] sensibler auf eine Belastung mit Luftschadstoffen reagieren als die intrazellulären Enzyme. Im Zusammenhang mit oxidativem Streß wurde eine erhöhte Sekretion von Peroxidasen in den Apoplasten beschrieben [CASTILLO et al., 1984a; 1987] und auch unter dem Einfluß von SO₂ wurde über eine Steigerung der Aktivität apoplastischer Peroxidasen berichtet [ROITTO et al., 1999].

Eine mögliche, durch Zellwand-Peroxidasen katalysierte Entgiftungsreaktion für Schwefeldioxid wurde von PFANZ und OPPMANN [1991] beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, daß apoplastische Peroxidasen *in vitro* die Fähigkeit zur Oxidation von Sulfit (SO₃²⁻) zu Sulfat (SO₄²⁻) besitzen.

Die Sulfitoxidation läuft unter Vermittlung von H₂O₂ und phenolischen Verbindungen wahrscheinlich gemäß den Gleichungen 10 bis 13 ab:



[zusammengestellt aus FRIDOVICH und HANDLER, 1961; MOTTLEY et al., 1982; MOTTLEY und MASON, 1988]

Das entstehende Sulfat ist 20 mal weniger toxisch als Sulfit [ELSTNER und HIPPELI, 1995] und das bei der Lösung von SO_2 in der Wasserphase der Zellwand entstehende Dissoziationsgleichgewicht (siehe Gleichg. 1, Kap. 1.2) wird durch Entzug des Sulfits bei dessen Umwandlung in Sulfat verschoben. Dies könnte zur Verminderung des Einstroms von SO_2 in die Pflanzenzelle beitragen, indem das eindringende, sehr gut membranpermeable SO_2 verstärkt in Sulfit umgewandelt wird und damit in die ionische Form überführt wird, die aktiv und daher langsamer durch die Cytoplasmamembran transportiert wird [PFANZ und OPPMANN, 1991]. Zudem wird durch die Erhöhung der Oxidationsstufe des Schwefels dessen Metabolisierung und damit Entgiftung gefördert.

2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, zu klären, ob und in welchem Maße Jungpflanzen der Baumarten *Fagus sylvatica*, *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* durch eine Langzeitbelastung mit den Luftschadstoffen SO_2 und Ozon in ihrer Vitalität beeinträchtigt werden und ob durch die Einwirkung dieser Schadstoffe Prozesse zur Streßbewältigung initiiert werden.

Neben grundlegenden physiologischen, morphologischen und anatomischen Untersuchungen zum Verhalten der Laubbäume unter diesen Bedingungen sollten insbesondere die Eigenschaften und das Reaktionsverhalten der Peroxidasen des Blatt-Apoplasten genauer untersucht werden. Die Sulfit- und die IAA-Oxidationsraten der Peroxidasen sollten dabei als Aktivitätsparameter sowohl im normalen jahreszeitlichen Verlauf als auch im Zusammenhang mit der Schadstoffeinwirkung mit Hilfe von *in vitro* Tests gemessen werden.

Da die Oxidation von Sulfit durch Zellwand-Peroxidasen bereits im Apoplasten zu dessen Entgiftung führen würde, waren Änderungen dieser Enzymaktivität infolge der Immissionsbelastung von besonderem Interesse. Damit sollte ein Beitrag zur Klärung der Frage geleistet werden, ob die apoplastischen Peroxidasen in den Blättern der drei Laubbaumarten an einer gezielten Abwehrreaktion auf Luftschadstoffe beteiligt sind. Es war dabei ebenfalls zu prüfen, ob die Peroxidaseaktivität als Frühindikator für eine Luftschadstoffbelastung der Pflanzen fungieren kann.

Aus der Messung der IAA-Oxidase-Aktivität der Peroxidasen sollten Informationen darüber gewonnen werden, inwieweit die Schadstoffbelastung durch eine Beeinflussung der Peroxidaseaktivität in den Auxin-Abbau eingreifen kann und wie sich diese Enzymaktivität im Vergleich zur Sulfitoxidations-Aktivität verhält.

Darüber hinaus war es das Ziel der Arbeit, die Auswirkungen der im Freiland häufig auftretenden Streßfaktoren Trockenheit, Blattverwundung und Befall mit der Buchenblatt-Baumlaus (*Phyllaphis fagi* L.) auf die Herausbildung makroskopischer Schädigungssymptome, den Pigmentgehalt und die Peroxidaseaktivität von *Fagus sylvatica* zu untersuchen.

3 Material und Methoden

Alle durchgeführten Versuche lassen sich drei inhaltlichen Schwerpunkten zuordnen.

- 1.) Versuche zur Reaktion der drei Baumarten auf Immissionsbelastung mit Schwefeldioxid und Ozon
- 2.) Untersuchungen zum Einfluß weiterer im natürlichen Lebensraum der Baumarten auftretender biotischer und abiotischer Stressoren am Beispiel der Rot-Buche
- 3.) Untersuchungen zu verschiedenen Faktoren die die enzymatische Aktivität der Zellwand-Peroxidasen beeinflussen

3.1 Pflanzenmaterial und Versuchsaufbau

3.1.1 Immissionsstreß-Versuche

3.1.1.1 Versuchsaufbau

Für die Begasungsversuche fanden dreijährige Jungpflanzen der Baumarten *Fagus sylvatica*, *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* Verwendung. Es handelte sich hierbei um Pflanzen aus herkunftsreinem Saatgut aus den mittleren Erzgebirgsregionen (Höhenlage etwa 400 m). Sie wurden vom Sächsischen Forstamt Heinzebank (Herkunftsgebiet 59) bezogen. Die Pflanzen wurden im Juli 1995 in ein Gemisch aus gleichen Teilen Humus, Sand und lehmigem Porphyroverwitterungsboden getopft, wobei jeweils drei (*Fagus*) bzw. zwei (*Betula* und *Sorbus*) Pflanzen in ein 10 l-Pflanzgefäß gesetzt wurden. Das Pflanzenmaterial wurde gleichmäßig auf drei Open-Top-Kammern (OTC) des Immissionsökologischen Meßfeldes der TU Dresden verteilt; jede Versuchskabine enthielt jeweils 12 Pflanzgefäße jeder Baumart.



Abbildung 1: Open-Top-Kammer auf dem immissionsökologischen Meßfeld der TU Dresden mit Versuchspflanzen

Durch die Aufteilung der Pflanzen auf drei Kammern war die Durchführung eines Immissionsbelastungs-Versuches mit dem in der Tabelle 3 dargestellten Versuchsregime möglich:

Tabelle 3: Versuchsablauf der OTC-Langzeitstudie

	Behandlungsvariante Konzentration	Zeitraum
OTC 1	60 $\mu\text{g SO}_2 / \text{m}^3$	07.08.1995 - 01.10.1995
	80 $\mu\text{g SO}_2 / \text{m}^3$	02.10.1995 - 06.12.1995 15.04.1996 - 30.10.1996 28.04.1997 - 13.11.1997
OTC 2	30 $\mu\text{g SO}_2 / \text{m}^3$ + 30 $\mu\text{g O}_3 / \text{m}^3$	07.08.1995 - 01.10.1995
	80 $\mu\text{g SO}_2 / \text{m}^3$ + 120 $\mu\text{g O}_3 / \text{m}^3$	02.10.1995 - 06.12.1995 15.04.1996 - 30.10.1996 28.04.1997 - 13.11.1997
OTC 3	Kontrolle gefilterte Reinluft	gesamter Versuchszeitraum

Die technische Ausführung der Begasung und die Bewässerung der Versuchspflanzen erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Pflanzenchemie und Holzchemie der TU Dresden. Die Konzentrationen der Gase wurden unter Berücksichtigung der mittleren und maximal auftretenden Schadstoffkonzentrationen im Osterzgebirge festgelegt (vgl. Tabelle 2, Kap. 1.1). Die Begasung erfolgte kontinuierlich von Montag bis Freitag, an den Wochenenden und in den, technisch bedingt, begasungsfreien Wintermonaten erfolgte eine Lüftung aller drei Kabinen mit Reinluft. Die in den Kammern befindliche Luft wurde durch ein in die Außenwand integriertes Gebläse ständig durchmischt.

3.1.1.2 Zeitpunkt der Probenahmen

Mit der Entnahme von Blattproben wurde jeweils begonnen, wenn die Blätter voll ausgebildet und damit hinreichend stabil für die Arbeitsschritte zur Gewinnung der apoplastischen Peroxidasen waren (vgl. Kap. 3.5).

Die Probenahmen erfolgten in den Vegetationsperioden 1996 und 1997. Beide Probenahmeperioden lagen zwischen Anfang Juni und Anfang Oktober.

In der Vegetationsperiode 1996 fanden die Probenahmen zu folgenden Zeitpunkten statt:

- 1.) 05. - 12. 06. 1996
- 2.) 29. - 31. 07 1996
- 3.) 02. - 11. 09. 1996
- 4.) 07. - 08. 10. 1996

Der große Abstand zwischen der ersten und zweiten Probenahme resultiert aus der in diesem Zeitraum erfolgten zweimaligen Behandlung der Pflanzen mit Insektizid (Wirkstoffe Clofentezin und Dimethoat). Anfang August wurden die Pflanzen ein drittes Mal mit beiden Wirkstoffen behandelt.

Die Insektizidbehandlungen waren aufgrund des Auftretens der Buchenblatt-Baumlaus (*Phyllaphis fagi* L.) und einer Schildlaus-Art erforderlich.

Leider erbrachten diese Maßnahmen insbesondere im Fall von *Phyllaphis fagi* keinen deutlichen Effekt, so daß die Buchen im Verlauf der Vegetationsperiode relativ stark geschädigt wurden.

In der Konsequenz aus diesen Erfahrungen wurden die Pflanzen 1997 bereits Anfang März und Anfang Mai einer Insektizidbehandlung unterzogen, um möglichst frühzeitig eine Ausbreitung der Schädlinge zu verhindern. Im Fall der Schildläuse erbrachte dies den gewünschten Erfolg, die Blattläuse konnten nur zeitweilig eingedämmt werden.

Da die Vitalität der Buchen ohnehin sehr stark vermindert war, mußte 1997 auf eine Probenahme bei dieser Baumart verzichtet werden.

Die Birken und Ebereschen wurden 1997 zu folgenden Zeitpunkten beprobt:

- 1.) 03. 06. 1997
- 2.) 23./ 24. 06. 1997
- 3.) 26./ 27. 08. 1997
- 4.) 01. 10. 1997

Bei der vierten Probenahme wurden lediglich Proben zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität geerntet.

Da die Versuchspflanzen bereits relativ groß waren, erfolgte Ende April eine Flüssigdüngung mit 45,7 mg P, 14,3 mg Mg, 18,9 mg S, 57,1 mg K und 28,6 mg N pro kg Boden. Mitte Mai wurde eine Nachdüngung mit Chrysal „multicote“[®]- Langzeitdünger (N:P:K = 2:1:2, Braun, Lemgo) durchgeführt. Es wurden gemäß den Angaben des Herstellers je 1,5 g Düngergranulat pro Topf in die Erdoberfläche eingearbeitet.

3.1.1.3 Visuelle Beurteilung des Schädigungsgrades der Pflanzen

Um die Auswirkungen der Immissionsbelastungen abschätzen und das zwangsläufig heterogene Probenmaterial besser charakterisieren zu können, erfolgte nach Abschluß jeder Probenahme eine Bonitierung der Versuchspflanzen und der geernteten Blattproben hinsichtlich visuell erkennbarer Merkmale. Hierbei fanden die Veränderung der Blattpigmentierung, die Ausbildung von Nekrosen, sowie die Wuchsform der Pflanzen und der Schädlingsbefall besondere Berücksichtigung.

Um die Blattfärbung und das gesamte Ausmaß der Schädigungen objektiver abschätzen zu können, wurde eine Farbtabelle mit verschiedenen, nummerierten Grün-, Gelb-, Rot- und Brauntönen zu Hilfe genommen (Abbildung 2). Der geschätzte Anteil unterschiedlich stark geschädigter Blätter pro Pflanze wurde protokolliert.

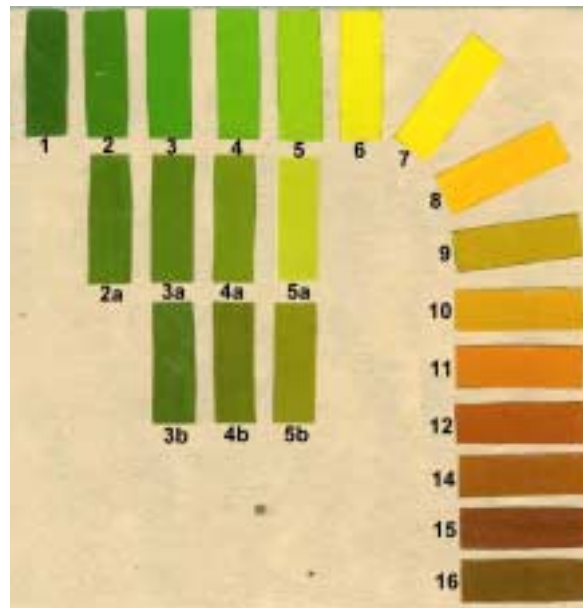


Abbildung 2: Farbtabelle zur Bonitierung der Blattfärbung. Den verschiedenen Farbtönen sind Nummern zugeordnet, anhand derer die Schädigung der Blattpigmente und deren Ausmaß bei der Bonitierung der Pflanzen festgehalten werden konnte.

Mit Hilfe der dokumentierten Farbwerte wurde eine Einteilung der Pflanzen in drei Gruppen vorgenommen. Hierfür wurde ein Farb-Grenzwert festgelegt, bei dem der grüne Farbton gerade noch über gelbe Farbtöne überwog (vgl. Abbildung 2 Wert 5, einschließlich 5a und 5b). Alle Pflanzen deren Blätter Farben oberhalb dieses Grenzwertes aufwiesen, wurden als „geschädigt“ bzw. „seneszent“ eingestuft. Diese Pflanzen wurden wiederum in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe enthielt alle Pflanzen bei denen einige Blätter Farben oberhalb des Wertes 5 hatten, bei denen aber die Mehrzahl der Blätter grün war. Die zweite Gruppe setzte sich aus den Pflanzen zusammen, bei denen mehr als 50% der Blätter Farbwerte oberhalb des Grenzwertes aufwiesen.

3.1.2 Untersuchungen zum Einfluß weiterer biotischer und abiotischer Stressoren

Neben den Untersuchungen zur Immissionsbelastung wurden 1997 Versuche zum Einfluß mehrerer, für die Pflanzen im OTC-Versuch und im Freiland relevanter Umweltfaktoren auf die apoplastischen Peroxidasen durchgeführt. Aufgrund ihrer waldbaulichen und ökologischen Bedeutung wurde die Baumart *Fagus sylvatica* für diese Versuche ausgewählt. Bei den hierfür verwendeten Rot-Buchen handelte es sich um vierjährige Jungpflanzen die, wie die Pflanzen im Immissionsstreß-Versuch, ebenfalls vom Forstamt Heinzebank (Herkunftsgebiet 59, Höhenlage etwa 400 m) bezogen wurden.

Die Pflanzen wurden entweder Trockenstreß, mechanischer Blattschädigung oder dem Befall mit *Phyllaphis fagi* (L.) ausgesetzt.

Die insgesamt 200 Pflanzen wurden jeweils zu zweit in Plastikpflanzgefäße (Inhalt: 13 l, Topfdurchmesser an der Oberfläche: 40 cm) in „Fruhstorfer Erde“[®] (Industrie-Erdenwerk Archut GmbH u. Co. KG, Lauterbach-Wallenrod) vom Typ „Puri“ (pH 5,5 - 6,5; 25% Vulkanton, 40% Torf, 25% Rindenhumus und 10% Reisspelzen) gepflanzt. Die Töpfe

wurden, um einheitliche Wachstumsbedingungen zu schaffen und die Trockenstreß- und Blattlaus-Versuche kontrollierbar zu gestalten, in Gewächshäuser aus Holzrahmen mit Foliebespannung, gesetzt (Abbildung 3). Die Beleuchtungsstärke unter der Folie betrug etwa 70 bis 85% der im Freien gemessenen Werte. Es gab keine Temperaturunterschiede zum Freiland, da durch die Möglichkeit, alle Seitenwände zu öffnen, stets eine gute Luftzirkulation gewährleistet war. Die Pflanzen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Bedarf gegossen.

Ab Anfang Juni wurden die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Versuche durchgeführt.



Abbildung 3: Gewächshäuser mit Versuchspflanzen

3.1.2.1 Einfluß des Befalls mit *Phyllaphis fagi* auf die Versuchspflanzen

Die Buchenblatt-Baumlaus (*Phyllaphis fagi* L.) gehört zu den Phloemsaugern und kommt insbesondere auf Jungpflanzen häufig massenweise vor. Ihr Gefährdungspotential für Buchenvoranbauten im Osterzgebirge wurde nach einer 1995 durchgeführten Untersuchung im Forstamt Altenberg als relativ hoch eingeschätzt [STEFFENS, 1996].

Das Vorkommen von *Phyllaphis fagi* auf einigen der Versuchspflanzen wurde für diesen Versuch genutzt, indem vier relativ stark befallene Pflanzen zunächst für einige Zeit in einem geschlossenen Raum weiterkultiviert wurden, während alle anderen Versuchspflanzen befallsfrei gehalten wurden. (Die Pflanzen wurden hierbei zunächst sorgfältig mit Wasser abgespült und in der Folgezeit häufig kontrolliert.) Nach der Festigung der Blätter im Frühsommer war in der Regel die Rate neu befallener Pflanzen geringer.

Für den Versuch wurden 16 nicht befallene Pflanzen ausgewählt und in ein separat stehendes Gewächshaus gesetzt. Ab Mitte Juni wurden die vier stark befallenen Pflanzen in dieses Gewächshaus eingebracht und somit eine Ausbreitung von *Phyllaphis fagi* auf alle Versuchspflanzen ermöglicht. Die erste Probenahme zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität wurde am Tag des Versuchsbeginns durchgeführt, zwei weitere Probenahmen erfolgten in jeweils 4-wöchigem Abstand. Die Bestimmung des Chlorophyll- und Wassergehaltes der Blätter erfolgte vor dem Versuch sowie 8,5 und 11 Wochen nach Versuchsbeginn. Eine Bestimmung des Interzellularraumvolumens der Blätter wurde 9 Wochen nach dem Beginn

des Versuches durchgeführt. Die Kontrollpflanzen (vgl. Kap. 3.1.2.4) wurden zeitgleich beprobt.

3.1.2.2 Untersuchungen zum Einfluß von Trockenstreß auf die Pflanzen

Die für diesen Versuch ausgewählten 20 Pflanzen wurden ab Anfang Juli zunächst völlig trocken gehalten und dann nach vier Wochen einmalig mit je 300 ml, bzw. nach fünfeinhalb Wochen einmalig mit je 500 ml Wasser gegossen. Bei jeder Probenahme erfolgte gleichzeitig aus ca. 10 cm Tiefe die Entnahme einer geringen Menge Pflanzsubstrat (~ 6 bis 15 g), um den Wassergehalt des Bodens zu bestimmen. Die Probenahmen für die Bestimmung der Peroxidaseaktivität erfolgten 2, 3 und 6,5 Wochen nach Versuchsbeginn. Nach sieben Wochen wurde der Trockenstreß beendet. Die Pflanzen wurden wieder nach Bedarf gewässert. Weitere 2,5 Wochen nach Ende des Trockenstreßversuches erfolgte eine zusätzliche Probenahme. Die Ermittlung des Chlorophyll- und Wassergehaltes erfolgte 2 Wochen nach Versuchsbeginn und 2,5 Wochen nach der Aufhebung des Trockenstress. Das Interzellularraumvolumen der Blätter wurde am Ende des Versuches und 2,5 Wochen nach der Wiederbewässerung ermittelt. Die nach Bedarf gegossenen Kontrollpflanzen wurden wiederum zeitgleich beprobt.



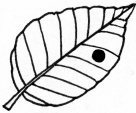
3.1.2.3 Auswirkungen von Blattverwundungen auf die Zellwand-Peroxidasen

Für diesen Versuch wurde das Pflanzenmaterial in 3 Gruppen (Va – Vc) aufgeteilt, die sich in Bezug auf die Zahl der Verwundungsstellen und deren Fläche unterschieden. Mit Hilfe zweier unterschiedlich großer Korkbohrer wurden auf den Blattspreiten verschieden große, kreisförmige Areale in unterschiedlicher Zahl ausgestanzt. Unter Berücksichtigung der Größe der einzelnen Pflanzen wurden jeweils 5 bis 10 Blätter in den Versuch einbezogen.

Die so behandelten Blätter wurden zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität 24 h nach der Verwundung beginnend, bis zum vierten Tag nach der Blattverwundung in Zeitintervallen von 24 h geerntet. Um länger andauernde Reaktionen auf die Blattverwundung zu erfassen, wurden bei einer Variante (Vb) nach einem Zeitraum von 10 Tagen und nach drei Wochen weitere Probenahmen durchgeführt. In der Tabelle 4 sind die Größe und Zahl der Verwundungen und die Probenahmezeitpunkte zusammengefaßt.

Die Gesamtfläche der bei der Variante Vb gesetzten 7 Verwundungen entsprach der Fläche der größeren Wunde bei Variante Va.

Tabelle 4: Aufbau des Wundstreß-Versuches

Variante (Zahl der Pflanzen)		Verwundungsfläche	Probenahmezeitpunkte nach der Verwundung
Va (10)		1 x 1,05 cm ²	1, 2, 3 und 4 Tage
Vb (20)		7 x 0,15 cm ²	1, 2, 3 und 4 Tage sowie 10 Tage und 3 Wochen
Vc (10)		1 x 0,15 cm ²	1, 2, 3 und 4 Tage

3.1.2.4 Kontrollpflanzen

Die Kontrollpflanzen waren etwa gleichmäßig über die Gewächshäuser verteilt (mit Ausnahme des Gewächshauses mit dem *Phyllaphis fagi*-Versuch). Sie wurden nach Bedarf gewässert.

3.1.3 Untersuchungen an einer adulten Buche

Zusätzlich zu den Untersuchungen an Jungpflanzen wurde über einen Zeitraum von 2 Jahren ein etwa 30 bis 40 jähriges Exemplar der Baumart *Fagus sylvatica* beprobt, um die apoplastischen Peroxidasen ausführlicher zu charakterisieren und weitere Daten über den zeitlichen Verlauf der Enzymaktivität zu erhalten.

Es handelte sich bei diesem Baum um eine als ungeschädigt eingestufte Buche im Ortsbereich von Tharandt (rund 250 m ü.NN), bei der eine gute bis sehr gute Versorgung mit Wasser und Nährstoffen vorausgesetzt werden konnte.

Auf die ausschließlich mit dem Blattmaterial dieser Pflanze durchgeführten Versuche wird nach Erläuterung der grundlegenden Methoden näher eingegangen (siehe Kap. 3.9).

3.2 Probenahmen

Pro Probenahme wurden bei den Immissionsstreß-Versuchen jeweils etwa 80 – 100 und bei den Gewächshausversuchen rund 50 - 60, möglichst gering beschattete Blätter gleichen Alters aus den mittleren Bereichen der Baumkronen in Form von Mischproben entnommen. Bei der Probenahme wurde darauf geachtet, daß keine an den Zweigspitzen befindlichen Blätter geerntet wurden. Das Blattmaterial wurde in mit Fließpapier feucht gehaltenen Plastikgefäßen transportiert und auf dem schnellstmöglichen Wege im Labor weiterverarbeitet.

Vom beprobten Altbaum wurden lichtexponierte Zweige aus dem mittleren Kronenbereich mit Hilfe einer Stangenschere entnommen und sofort unter Wasser nachgeschnitten. Die

Blätter wurden im Labor in der für die einzelnen Bestimmungen jeweils benötigten Menge mit Hilfe einer sehr scharfen Klinge ohne Blattstiel vom Zweig abgetrennt und sofort in ein Gefäß mit Waschlösung (vgl. Kap. 3.4) übertragen. Die Blätter wurden immer aus den mittleren Abschnitten der Zweige entnommen und die abgeschnittenen Zweige wurden nie länger als 6 Stunden zur Gewinnung der Blattproben verwendet.

3.3 Bestimmung des Chlorophyll- und Wassergehaltes der Blätter

Die Chlorophyll- und Wassergehalte wurden jeweils von den selben Blättern bestimmt. Die Proben für die Chlorophyllbestimmung wurden mit Hilfe eines Korkbohrers (Durchmesser 5,3 mm) im Zentrum der Blattfläche, seitlich der Mittelrippe entnommen. Es wurde darauf geachtet, daß die Proben möglichst nicht im Bereich größerer Blattnerven herausgetrennt wurden.

Nach sofortiger Wägung der Proben erfolgte eine Lagerung bei -30°C bis zur Extraktion des Chlorophylls mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt) bei 60°C im Dunkeln nach RONEN und GALUN [1984]. Die Bestimmung des Gesamtchlorophyll-Gehaltes erfolgte mittels photometrischer Messung der Extinktion bei 648, 665 und 700 nm und der Berechnung der Konzentration in Anlehnung an ARNON [1949] nach Gleichung 14

$$20,2 * (E_{648} - E_{700}) + 8,02 * (E_{665} - E_{700}) = \text{mg Chlorophyll} * \text{l}^{-1} \quad [14]$$

Zur Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte eine sofortige Wägung des nach Entnahme der Chlorophyllprobe verbliebenen Blattes mit Stanzloch und nachfolgend eine dreitägige Trocknung des Materials bei 60°C. Nach Abkühlung der Blattproben auf Raumtemperatur in einem Exsikkator wurden diese erneut gewogen und aus der erhaltenen Differenz zwischen Frisch - und Trockenmasse der Wassergehalt ermittelt.

3.4 Bestimmung des Interzellularraum-Volumens

Die Blätter wurden für die Bestimmung des Interzellularraum-Volumens mit einer scharfen Klinge oder Schere von den Zweigen abgetrennt und sofort weiterverarbeitet.

Um die Oberflächen der Blätter zu säubern und die Öffnungsweite der Stomata zu erhöhen, bzw. ein Öffnen geschlossener Stomata herbeizuführen, wurden die Blätter, nach Entfernung des Blattstiels, in einer Waschlösung aus 2 mM CaCl_2 + 4 mM KCl + 1% w/v Aktivkohle in Reinstwasser gewaschen und mit Hilfe eines Diaprojektors mit $800\text{-}1500 \mu\text{mol} * \text{cm}^{-2} * \text{min}^{-1}$ belichtet. Um die Blätter allseitig zu belichten, wurden sie mittels eines Glasstabes oder Magnetrührers in der Waschlösung bewegt.

Nach einer Belichtungszeit von etwa 30 bis maximal 50 min wurden jeweils einige Blätter entnommen, vorsichtig auf einem Baumwolltuch mit Zellstoff abgetrocknet und einzeln auf einer Präzisionswaage gewogen.

Nach der Bestimmung der Frischmasse folgte eine Infiltration von Reinstwasser über die geöffneten Stomata entsprechend einer Methode von PFANZ [1987]. Dazu wurden jeweils mehrere, gut unterscheidbare Blätter zusammen mit 25-35 ml Reinstwasser in eine 60 ml fassende Plastikspritze gefüllt. Unter Verschuß der vorderen Spritzenöffnung wurde durch Ein- und Auswärtsbewegung des Spritzenkolbens im Wechsel Unter- und Überdruck

angelegt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis alle Blätter untergesunken waren, mindestens jedoch drei Mal. Die Vollständigkeit der Infiltration konnte gut durch die Dunkelfärbung der infiltrierten Bereiche überprüft werden.

Danach wurde der Spritzeninhalt über einem Sieb ausgegossen. Die Blätter wurden vorsichtig abgetrocknet und sofort einzeln gewogen.

Nach der Wägung wurde das Material zur Bestimmung der Trockenmasse als Bezugsgröße für jedes Blatt wie in Kapitel 3.3 beschrieben weiterbehandelt.

Aus der Bestimmung der Differenz der Frischmassen vor und nach der Infiltration wurde die Menge des über die geöffneten Stomata infiltrierten Wassers pro Gramm Frisch- bzw. Trockenmasse und damit das Interzellularraum-Volumen bestimmt.

3.5 Gewinnung der Interzellulären Waschflüssigkeit (IWF)

Aufgrund der Kleinräumigkeit und Mikroporosität der Zellwände gestalten sich *in situ* Untersuchungen schwierig. Es ist jedoch möglich, lösliche Komponenten des Blatt-Apoplasten, zu denen auch ein großer Teil der Zellwand-Peroxidasen gehört, durch Infiltration einer Waschlösung über die Spaltöffnungen und Interzellularen der Blätter und die nachfolgende Extraktion dieser Lösung zu gewinnen und für *in vitro* Untersuchungen einzusetzen.

Die Gewinnung der Interzellulären Waschflüssigkeit (IWF) erfolgte in Anlehnung an PFANZ und OPPMANN [1991]. Hierfür wurde zunächst wie für die Bestimmung des Interzellularraumvolumens vorgegangen, es wurde jedoch anstelle des Reinstwassers eine Lösung aus 1 mM CaCl_2 + 4 mM KCl + 100 mM Sorbit (Karion® Pulver P300, Merck, Darmstadt) in Reinstwasser über die geöffneten Stomata infiltriert. Außerdem erfolgte lediglich ein einmaliger Wechsel von Unter- und Überdruck in der Spritze um eine Verdünnung der gelösten Substanzen zu vermeiden.

Es folgte eine 5 bis 10 minütige Lagerung der Blätter in einer feuchten Kammer um den Spüleffekt der Flüssigkeit in den Blättern zu erhöhen. Nach vorsichtiger Trocknung der Blattoberfläche mit Zellstoff wurde die in den Interzellularen befindliche Flüssigkeit über die geöffneten Stomata extrahiert. Dies erfolgte durch Zentrifugation der intakten Blätter. Die Blätter wurden hierfür zur Stabilisierung in perforierte Plastikhüllen eingerollt und in spitz zulaufenden Zentrifugengläsern mit der Blattspitze nach unten bei 4°C nach einem für die jeweilige Baumart in Vorversuchen ermittelten Modus zentrifugiert:

Fagus: 10 min bei 1750 x g + 15 min bei 2500 x g

Betula: 7 min bei 1750 x g + 7 min bei 2500 x g

Sorbus: 7 min bei 1590 x g + 7 min bei 1750 x g

Die Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit wurden dabei, entsprechend den Ergebnissen von Vorversuchen, so gewählt, daß die IWF-Ausbeute möglichst hoch war, die Blattzellen jedoch nicht durch die Zentrifugation zerstört wurden.

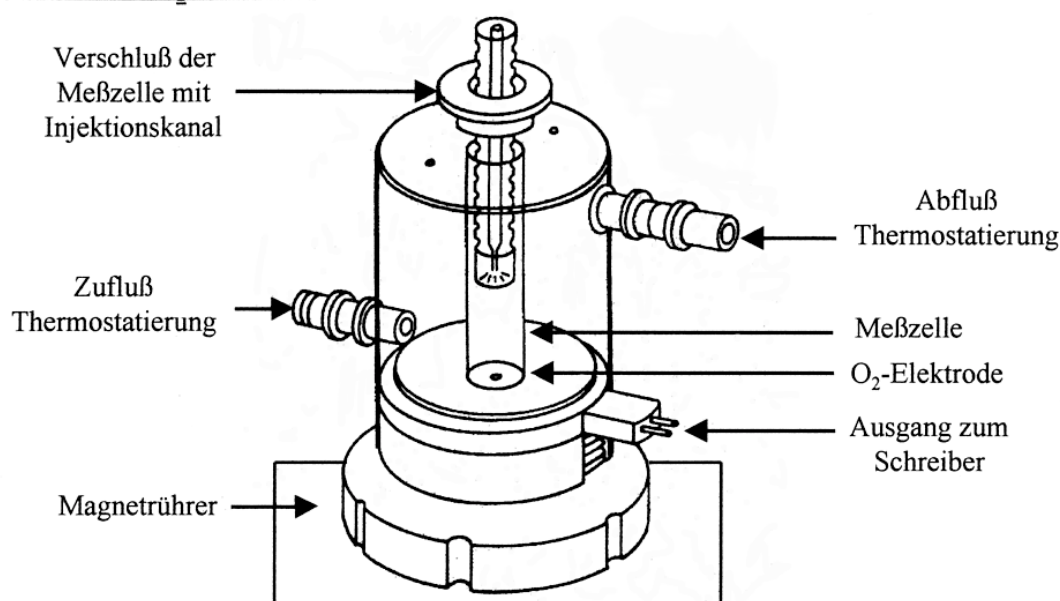
Ein in der Spitze der Zentrifugengläser befindlicher Kunststoffring ermöglichte eine sofortige Trennung der aus den Blättern austretenden Flüssigkeit vom Blattmaterial und verhinderte eine Kompression der Blätter in der Spitze des Zentrifugenglases.

Die gewonnene IWF wurde in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt, gut durchmischt, portioniert und danach sofort bis zur Verwendung bei -30°C tiefgefroren gelagert.

3.6 Bestimmung der Peroxidaseaktivität in der IWF

Die Bestimmung der Peroxidaseaktivität erfolgte *in vitro* durch Messung des Sauerstoffverbrauches während der Oxidation von Sulfit bzw. IAA. Die Messungen wurden mit Hilfe eines Meßsystems bestehend aus Sauerstoffelektroden vom Clark-Typ (Bachofer, Reutlingen) mit Thermostat-Einheit und angeschlossenen Zweikanal-Flachbettschreiber durchgeführt (Abbildung 4). Detaillierte Informationen zum Aufbau des Meßsystems und zur Meßmethodik mit diesem Elektroden-Typ wurden durch DELIEU und WALKER [1972] und durch WALKER [1987] publiziert.

Aufbau der O₂-Meßzelle:



Aufbau der O₂-Elektrode:

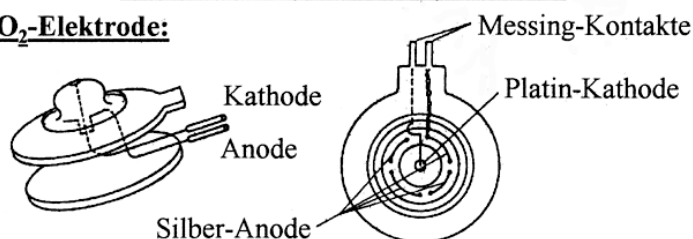


Abbildung 4: Schematische Darstellung der zentralen Geräteeinheit zur Messung der Sauerstoffzehrung bei der enzymatischen Sulfit- oder IAA-Oxidation [entnommen aus DELIEU und WALKER, 1972]. Die O₂-Elektrode bildet den Boden der Meßzelle.

3.6.1 Messung der Sulfitoxidationsraten

Die Zusammensetzung des Sulfitoxidations-Meßansatzes geht auf Angaben von OPPMANN [1990] zurück. Der Ansatz enthielt als Substrate bzw. Cosubstrate der Peroxidasen H₂O₂ (Merck, Darmstadt), Ferulasäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und Na₂SO₃ (Merck, Darmstadt). Die Messungen erfolgten in 250 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,8 (Puffersalz Merck, Darmstadt). Da es sich bei Anwendung der von OPPMANN [1990] mit IWF aus Fichtennadeln erarbeiteten Methodik zeigte, daß sich die Umsatzraten der Laubbaum-

Peroxidasen durch Erhöhung der Substrat- bzw. Cosubstratkonzentrationen steigern ließen, erfolgte eine Optimierung des Meßansatzes. Genauere Informationen zu den getesteten Substratkonzentrationen sind der Ergebnisdarstellung in Kap. 4.2.1 zu entnehmen.

Das einzusetzende IWF-Volumen wurde durch Erstellung von Umsatz-Volumen-Kurven ermittelt.

Die Messungen wurden zur besseren Handhabung jeweils mit einer 1:20 verdünnten IWF durchgeführt. Die Verdünnung erfolgte in 250 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,8. Es wurden 0,5 bzw. 1 µl der verdünnten IWF eingesetzt.

Nach der Methodenoptimierung enthielten die Testansätze die in Tabelle 5 aufgeführten Substratkonzentrationen in 250 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,8

Tabelle 5: Konzentrationen der in den Versuchsansätzen zur Messung der Sulfitoxidationsraten verwendeten Substrate für die drei untersuchten Baumarten

	H ₂ O ₂ [mM]	Ferulasäure [mM]	Na ₂ SO ₃ [mM]
<i>Fagus sylvatica</i>	0,2	0,35	1,5
<i>Betula pendula</i>	0,25	0,25	1,5
<i>Sorbus aucuparia</i>	0,25	0,35	1,5

Wasserstoffperoxid und Natriumsulfit wurden hierbei in Wasser auf eine Konzentration von 100 mM vorverdünnt. Die Ferulasäure fungierte als Wasserstoffdonor (vgl. Kap. 1.4). Sie wurde aufgrund ihrer geringen Löslichkeit in Wasser zunächst in reinem Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt) vorgelöst und dann von dieser Lösung (1 M) mit 50%igem DMSO bis zu einer Konzentration von 100 mM verdünnt. Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug jeweils 1 ml. Es wurde bei einer Temperatur von 20°C gemessen. Die drei Substrate wurden im Abstand von etwa 1 - 1,5 min in der Reihenfolge ihrer Auflistung in Tabelle 5 zum Reaktionsansatz zugegeben. Die IWF wurde etwa 3 bis 4 min später, nach der Messung der Autoxidationsrate des Na₂SO₃ zugesetzt (vgl. Abbildung 5).

3.6.2 IAA-Oxidation

Die Oxidation von Indol-3-essigsäure (IAA) durch die apoplastischen Peroxidasen wurde mit Hilfe der Sauerstoffelektroden auf die gleiche Weise wie die Sulfitoxidation gemessen. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes geht auf PFANZ [1993] zurück, wurde aber ebenfalls nach ausführlichen Vorversuchen den Baumarten entsprechend modifiziert (getestete Substratkonzentrationen siehe Kap. 4.2.2). Die Messung erfolgte in 30 mM Citrat-Puffer pH 4,0. (Puffersalz, Merck, Darmstadt). Der optimierte Testansatz enthielt H₂O₂, p-Cumarsäure (als Wasserstoffdonor, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und IAA (Sigma, Deisenhofen) in den in Tabelle 6 angegebenen Endkonzentrationen.

Tabelle 6: Endkonzentrationen der in den Versuchsansätzen zur Messung der IAA-Oxidationsraten verwendeten Substrate für die drei untersuchten Baumarten

	H ₂ O ₂ [mM]	Cumarsäure [mM]	IAA [mM]
<i>Fagus sylvatica</i>	1	7	14
<i>Betula pendula</i>	1	8	14
<i>Sorbus aucuparia</i>	1,25	9	12

H₂O₂ wurde in Wasser gelöst, während die IAA und die Cumarsäure zunächst in DMSO gelöst wurden (jeweils 1 M). Das Gesamtvolumen des Testansatzes betrug ebenfalls 1 ml. Die Reaktionen wurden bei 20°C gemessen. Die drei Substrate wurden in der in Tabelle 6 genannten Reihenfolge im Abstand von etwa 1 - 1,5 min zum Reaktionsansatz zugegeben. Die 1:20 in Puffer verdünnte IWF wurde wiederum nach der Messung der Autoxidationsrate zugesetzt. Es wurden jeweils 2 µl verdünnte IWF zugegeben.

Bei beiden Enzymtests wurde die vollständige Durchmischung der Lösung in der Meßzelle durch einen in das System integrierten Magnetrührer gewährleistet. Die Pufferlösung wurde jeweils in der Meßzelle vorgelegt, während die Substrate und die IWF nach der Äquilibration der Lösung mit Hilfe von Mikroliterspritzen über den Injektionskanal zugegeben wurden.

Der Sauerstoffverbrauch in der mit einem Stößel verschlossenen Meßzelle wurde als Kurve vom Flachbettsschreiber aufgezeichnet (Abbildung 5).

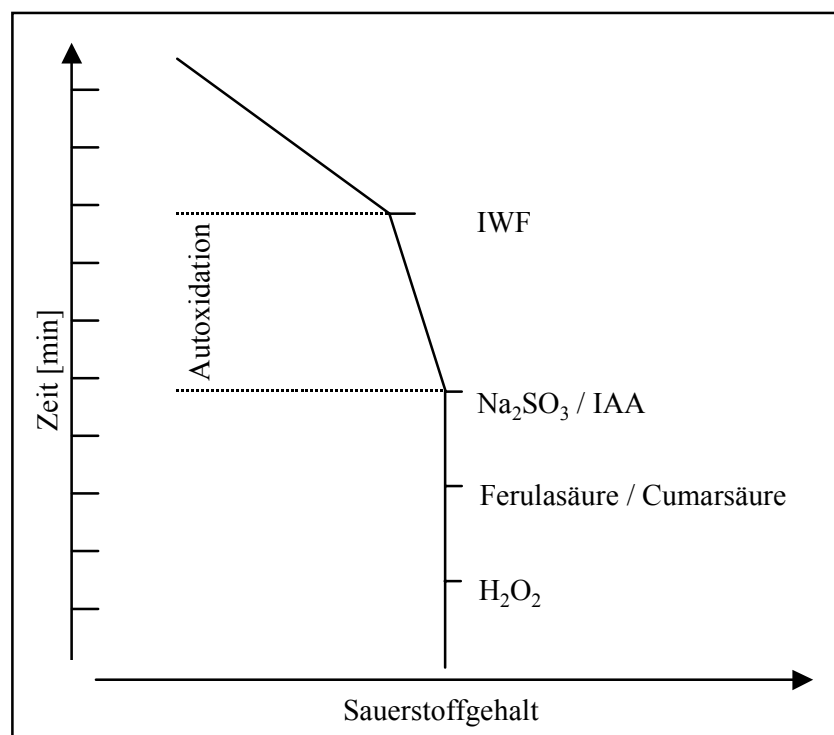


Abbildung 5: Schematische Darstellung des auf dem Flachbettsschreiber registrierten Kurvenverlaufs bei der Sulfite- bzw. IAA-Oxidation durch apoplastische Peroxidasen.

Die Sulfit- und IAA-Oxidationsrate wurde aus der Differenz der Kurvenanstiege von Autoxidation und enzymatisch katalysierter Oxidation des Sulfits bzw. der IAA ermittelt. Der Sauerstoffverbrauch wurde mit Hilfe einer Zweipunktkalibrierung berechnet, bei der aus einer vollkommen sauerstoffgesättigten Lösung durch Zugabe von $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ sämtlicher Sauerstoff gezehrt wurde.

Bei vielen Meßreihen wurde käuflich erworbene Meerrettich-Peroxidase (Sigma, Deisenhofen; Typ VI; Aktivität: 250-330 units pro mg) als Standard eingesetzt. Dabei wurden jeweils 1000 units in 1 ml 100 mM HEPES-Puffer pH 7,5 aufgelöst und wie die IWF in einer 1:20-Verdünnung zur Messung an der Sauerstoffelektrode verwendet. Der Puffer und die Substratkonzentrationen entsprachen dabei denen, die bei der jeweiligen Meßreihe verwendet wurden.

3.7 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts der IWF wurde mit Hilfe von Roti[®]-Nanoquant-Farblösung (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Das Färbeprinzip beruht nach Angaben des Herstellers auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach BRADFORD [1976].

Vor dem Färbeschritt erfolgte eine Vorreinigung der Proteine nach einer von OPPMANN und PFANZ (unveröff.) für IWF von Nadelbäumen entwickelten und für die Laubbaum-IWF modifizierten Methode.

- Ausfällung der Proteine:

- 15 µl IWF + 60 µl eines kalten (4°C) Gemisches aus 250 µl 16 M Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt) und 50 ml absolutem Ethanol
- Mischen und 120 min Inkubation bei -20°C
- 7 min Zentrifugation bei 20200 x g (Tischzentrifuge mit Ausschwingrotor, Modell 5417C, Eppendorf, Hamburg)

- Reinigung

- Abnahme des Überstandes
- Zugabe von 75 µl kaltem (4°C), absolutem Ethanol
- Mischen
- 7 min Zentrifugation bei 20200 x g
- insgesamt dreimalige Durchführung dieses Reinigungsschrittes

- Trocknung

- Abnahme des Überstandes
- Trocknung des Sediments 120 min bei 60°C (oder 2 Tage im Exsikkator)

- Rücklösung

- Zugabe von 15 µl 1%igem Triton-X100[®] (Sigma, Deisenhofen)
- kräftiges Durchmischen (Minishaker, MS 1, IKA Labortechnik, Staufen) und 10 – 15 min Schütteln (Promax 2020, Heidolph, Kehlheim)
- Zugabe von 385 µl Reinstwasser
- Mischen und 10 – 15 min Schütteln

- Entfernung phenolischer Bestandteile der IWF

- Zugabe von 6 mg Polyclar AT[®] (Polyvinylpyrrolidon, Serva, Heidelberg, vorgereinigt mit Reinstwasser und getrocknet)
- kräftiges Durchmischen und 60 min Schütteln
- 10 min Zentrifugation bei 20200 x g

•Proteinbestimmung:

- Abnahme von 200 µl Überstand aus der vorgereinigten Probe
- Zugabe von 800 µl Roti[®]-Nanoquant-Arbeitslösung (1:5-Verdünnung der Ausgangslösung)
- Mischen
- Messung der Extinktion bei 590 und 450 nm gegen Wasser am Photometer (DU 68, Beckman Coulter Inc., Fullerton, U.S.A.))
- Berechnung des Quotienten E_{590} / E_{450}
- Ermittlung der Proteinkonzentration mit Hilfe einer zuvor erstellten Eichreihe mit BSA (Albumin Standard, No. 23209, Pearce, Rockford, U.S.A.), Proteinkonzentrationen: 1 – 100 µg / ml

3.8 Auftrennung der Peroxidase-Isoformen mittels Isoelektrischer Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung der Peroxidaseproteine aus verschiedenen Versuchen wurde am Institut für Pflanzen- und Holzchemie der TU Dresden durch Frau Dipl.-Biochem. Anette Lehmann durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Polyacrylamid-Flachbettgelen („Rotiphorese[®] Gel“ – Fertiglösung mit 0,8% Bisacrylamid, Roth, Karlsruhe; Gel-Dicke 0,3 mm) mit einer „Multiphor II“-Elektrophoresekammer der Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden). Der mit Ampholinen (Serva, Heidelberg, bzw. LKB, Uppsala, Schweden) eingestellte pH-Bereich lag zwischen pH 2,5 und pH 10. Im sauren Bereich der Gele erfolgte eine leichte Spreizung der pH-Bereiche nach JANKOWSKY [1993], da sich dies als günstig für die Verbesserung der Auflösung der Banden und der densitometrischen Auswertbarkeit erwiesen hatte. Die jeweils 24 Proben wurden im Abstand von 3 cm zur Kathode aufgetragen. Das optimale Probenvolumen wurde mit Hilfe von Vorversuchen ermittelt und betrug je 7 µl unverdünnte IWF.

Die Visualisierung der Peroxidaseproteine im Gel erfolgte nach PEISKER [1985] mit folgendem Färbeansatz:

110 mg Guajacol und 40 mg Benzidin (beides jeweils gelöst in 2,5 ml Methanol) wurden in je 145 ml 0,2 M Natrium-Acetat-Puffer pH 5,5 aufgenommen. Kurz vor dem Färben des Gels wurden diesem Ansatz 100 µl 30%iges H₂O₂ zugesetzt. Nach einer Reaktionsdauer von rund 20 min unter visueller Kontrolle wurden die Gele in Wasser gespült und getrocknet. Die Auswertung der von den Gelen erstellten Densitogramme (Densitometer: „Elscript 400“, Hirschmann Gerätebau, München) erfolgte mittels „Elscript“-Auswertesoftware (ebenfalls Hirschmann Gerätebau).

3.9 Einflußfaktoren auf die enzymatischen Eigenschaften der Zellwand-Peroxidasen

Ausgehend von den oben beschriebenen Enzymtests wurden verschiedene Fragestellungen untersucht, die zum besseren Verständnis der Eigenschaften der apoplastischen Peroxidasen beitragen sollten. Hierfür wurden Blätter bzw. IWF des Buchen-Altbaumes verwendet, da nur bei diesem Baum ausreichend Material für alle Versuche geerntet werden konnte.

3.9.1 Untersuchungen zur Zusammensetzung und Einwirkungszeit der Infiltrationslösung

Mit Hilfe des optimierten Tests zur Sulfitoxidation von Buchen-Peroxidasen wurde überprüft, ob die KCl- und die CaCl_2 -Konzentration, die Einwirkungszeit oder der pH-Wert der Infiltrationslösung in den Blättern einen Einfluß auf die Aktivität der Peroxidasen bzw. die Zahl der isolierten Enzym-Isoformen hatte.

Hierbei wurden zunächst die Konzentrationen von KCl und CaCl_2 sowie die Inkubationszeit der infiltrierten Lösung erhöht. Der Sorbitanteil blieb konstant. Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die Versuchsansätze:

Tabelle 7: Versuchsansätze zur Untersuchung der Wirkung veränderter Ionenkonzentrationen und Einwirkungszeiten der Infiltrationslösungen bei Blättern von *Fagus sylvatica*. In der ersten Zeile sind die Angaben zum normalerweise verwendeten Standardansatz (Kontrolle) enthalten.

Konzentration KCl [mM]	Konzentration CaCl_2 [mM]	Zeit zwischen Infiltration und Zentrifugation [min]
4	1	10 - 15
200	1	10 - 15
250	1	10 - 15
4	5	10 - 15
4	5	30
4	10	10 - 15
4	15	10 - 15
4	15	30
4	30	10 - 15
4	50	10 - 15
4	50	30
4	200	10 - 15
4	250	10 - 15

In einem zweiten Versuch sollte überprüft werden, welchen Einfluß die Verwendung einer gepufferten, schwach sauren oder basischen Infiltrationslösung auf die Peroxidaseaktivität in der IWF und auf die Art und Zahl der darin enthaltenen Peroxidase-Isoformen hatte. Zur Herstellung der gepufferten Infiltrationslösung wurde 100 mM Natriumphosphat-Puffer

anstelle des Reinstwassers verwendet. Die Konzentrationen von KCl, CaCl₂ und Sorbit entsprachen dem Standardansatz. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von KOH und HCl auf 6,5 und 8,5 eingestellt. Der pH-Wert der schwach sauren Infiltrationslösung entsprach dabei dem in der Zellwandphase herrschenden pH-Wert (vgl. Kap. 4.1.2.2).

Nach der IWF-Gewinnung wurden bei beiden Versuchen die Sulfitoxidationsraten der Peroxidasen gemessen und mit dem Standardansatz (Kontrolle) verglichen. Einige der IWF-Proben wurden mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung der Proteine hinsichtlich der Peroxidase-Isoformen in der IWF überprüft.

3.9.2 Temperaturstabilität der Peroxidasen

Um die Temperaturstabilität der Peroxidasen zu bestimmen und zu überprüfen, ob die gemessenen Sauerstoffzehrungen tatsächlich durch enzymatische Umsetzungen hervorgerufen wurden, erfolgte eine Aufteilung der IWF in Aliquots, die unterschiedlich lange in einem Blockthermostat einer Temperatur von 100°C ausgesetzt wurden. Die Inkubationszeiten betrugen dabei zwischen 1 und 55 min. Direkt danach wurden die Sulfitoxidationsraten der so behandelten Peroxidasen im Standardansatz (vgl. Kap. 3.6.1) bestimmt und mit denen von unbehandelter IWF verglichen.

3.9.3 Abhängigkeit der Sulfitoxidation vom pH-Wert

Um die Abhängigkeit der Sulfitoxidation vom pH-Wert zu überprüfen, wurde der pH-Wert des Puffers in der Küvette der Sauerstoffelektrode mit Hilfe von 1 N KOH bzw. 1 N HCl modifiziert. Die Stabilität des eingestellten pH-Wertes wurde über eine in den Verschluß der Küvette integrierte pH-Elektrode (Einstabmeßkette, Inlet 423, Mettler-Toledo GmbH Analytical, Schwerzenbach, Schweiz, Ø 3 mm) bei allen Messungen während der gesamten Meßzeit überprüft. Die Messungen wurden in einem Bereich von pH 5,5 bis 10,5 durchgeführt.

3.9.4 Einfluß von Ascorbat auf die Sulfitoxidationsraten

Ascorbat ist ein im Apoplasten vorkommender Radikalfänger und ein potentielles Substrat der Peroxidasen. Mit diesem Versuch sollten die Wechselwirkungen zwischen Ascorbat und den löslichen Zellwand-Peroxidasen im Hinblick auf deren Fähigkeit, die Sulfitoxidation zu katalysieren, überprüft werden.

Das Ascorbat (Sigma, Deisenhofen) wurde in Wasser gelöst und dem *in vitro*-Meßansatz nach der Zugabe aller anderen Substrate zugesetzt. Die Endkonzentrationen im Meßansatz lagen zwischen 1 nM und 0,8 µM.

3.10 Weitere Charakterisierung des Pflanzenmaterials aus dem Immissionsstreß-Versuch

3.10.1 Blattflächenmessung

Die Bestimmung der Blattfläche als wichtiger Bezugsgröße erfolgte mit Hilfe des “Delta-T Image Analysis Systems” und “DIAS Version 1.12”-Software (beides Delta-T Devices LTD, Cambridge, UK).

Das Meßprinzip dieses Gerätes beruht auf der Bestimmung der Größe dunkler Flächen vor dem hellen Hintergrund eines Leuchttisches. Das Bild eines auf dem Leuchttisch befindlichen Blattes wurde durch eine Kamera aufgenommen und digitalisiert. Danach wurde die Blattfläche mit Hilfe zuvor eingegebener Eichwerte errechnet.

Zur Bestimmung der Blattflächen wurden zunächst Kopien der Blätter auf Folie angefertigt und diese dann zur Messung auf den Leuchttisch gelegt.

Die Meßgenauigkeit des Gerätes wurde mit Hilfe eines exakt 1 cm² großen, geschwärzten Papierstückes überprüft.

3.10.2 Bestimmung der pH-Werte und Pufferkapazitäten von Blatthomogenaten

Die Bestimmung der pH-Werte und Pufferkapazitäten von Blatthomogenaten erfolgte nach Angaben von PFANZ und HEBER [1986]. Jeweils etwa 1,3 bis 3 g tiefgefrorenes Blattmaterial der OTC-Pflanzen wurden unter flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser homogenisiert und anschließend in 30 ml Reinstwasser suspendiert. Der pH-Wert der Suspension wurde bestimmt und danach mit KOH und HCl auf pH 10 eingestellt. Danach erfolgte unter Rühren eine schrittweise Titration der Lösung mit 1 N HCl bis zum Erreichen von pH 3. Das bei jedem Schritt zugegebene Säurevolumen wurde in der Auswertung dem verringerten pH-Wert, der aus dieser Säurezugabe resultierte, gegenübergestellt. Als Bezugsgröße diente die Frischmasse.

3.10.3 Elementgehalte der Blätter

Die Bestimmung der Elementgehalte der Blätter erfolgte an getrocknetem, pulverisiertem Blattmaterial, das vorwiegend im Juli und August der beiden Vegetationsperioden 1996 und 1997 in den Open-Top-Kammern geerntet worden war. Die Untersuchungen (CHN- und ICP-Multielementanalyse) wurden im Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg, am Lehrstuhl Botanik I, von Frau E. Reisberg durchgeführt.

3.10.4 Abschluß des Immissionsstreß-Versuches - Bestimmung verschiedener Wachstumsparameter

Nach dem Ende der Vegetationsperiode 1997 sollte überprüft werden, ob der Einfluß der Luftschadstoffe bereits nach zweieinhalb Vegetationsperioden meßbare Veränderungen im

Wuchsverhalten der Pflanzen bewirkt hatte. Aus diesem Grunde wurden alle Pflanzen im Dezember 1997 aus den Open-Top-Kammern entnommen und folgende Parameter bestimmt:

- 1) Gesamthöhe der Pflanze oberhalb des Wurzelansatzes
- 2) Stammdurchmesser 5 cm über dem Boden
- 3) Frischmasse der gesamten Pflanze im blattlosen Zustand ohne Wurzel

Vorzeitig abgestorbene Pflanzen wurden nicht vermessen.

3.11 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der Blätter wurden am Lehrstuhl für Forstnutzung der TU Dresden in Zusammenarbeit mit Herrn E. Bäucker und Frau L. Stirl durchgeführt.

Das Pflanzenmaterial wurde hierfür entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren, oder sehr frisch in einer 3%igen, natriumphosphatgepufferten Glutaraldehydlösung fixiert.

Die gefrorenen Blätter wurden in einem Kryopräparationssystem vom Typ K1250 (Emitech LTD., Ashford, U.K.) im Hochvakuum bei -140 bis -150°C gebrochen. Danach erfolgte, ebenfalls im Hochvakuum, eine sehr langsame Erwärmung auf Raumtemperatur. Das so getrocknete Material wurde mit Gold beschichtet.

Die Entwässerung der mit Glutaraldehyd fixierten Proben erfolgte über eine Acetonreihe, danach wurde dieses Material ebenfalls mit Gold bedampft.

Nach diesen Präparationsschritten wurden die Blattproben mit einem Rasterelektronenmikroskop vom Typ JSM - T330A (JEOL LTD., Tokyo, Japan) mit angeschlossenem Bildverarbeitungssystem (Tescan TIP 92, TESCANA s.r.o., BRNO, CSFR) untersucht.

Da die Zellen unter diesen Präparationsbedingungen keine Schrumpfungerscheinungen zeigten, wurden die bei den REM-Untersuchungen erhaltenen Fotografien zur Messung von anatomischen Parametern wie Blattdicken, Zellgrößen und Zellwanddicken herangezogen. Hierbei wurde die auf den Fotos vorgegebene Mikrometermarkierung als Maßstab genutzt.

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des erhaltenen Datenmaterials erfolgte mit Hilfe des t-Tests nach STUDENT [1908], bzw. durch Anwendung des nichtparametrischen U-Tests nach MANN und WHITNEY [1947]. Hierfür wurde die Statistik-Software „Statistica“ (StatSoft Inc., Tulsa, U.S.A.) genutzt. Die Angaben zur Signifikanz der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erfolgen als Irrtumswahrscheinlichkeit p für die Richtigkeit der Hypothese, daß die jeweils verglichenen Gruppen keiner gemeinsamen Grundgesamtheit angehören.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Der Apoplast

Bei der Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse soll zunächst der extracytoplasmatische Raum mit seinen anatomischen, chemischen und physiologischen Charakteristika näher betrachtet werden.

Der Bereich außerhalb der Zellmembranen ist unterteilbar in den gaserfüllten Interzellularraum über den der Gaswechsel mit der Umwelt vollzogen wird und den Apoplasten, der alle Zellwände, den das Zellwandmaterial bedeckenden Flüssigkeitsfilm und die darin gelösten bzw. suspendierten Substanzen umfaßt.

Hinsichtlich der physiko-chemischen Eigenschaften des Apoplasten unterscheidet man einen Bereich, in dem eine freie Diffusion aller Teilchen im Flüssigkeitsfilm möglich ist („Water free space“) und einen Bereich, in dem geladene Teilchen von festgelegten Ladungen im Zellwandmaterial in ihrer freien Beweglichkeit gehindert werden („Donnan free space“). Beide Bereiche bilden gemeinsam den apparenten freien Diffusionsraum („Apparent free space“) [PITMANN et al., 1974; MOHR und SCHOPFER, 1978].

Die Eigenschaften des Apoplasten sind in der heterogenen Zusammensetzung der Zellwand begründet. Die Zellwand besteht aus reißfesten, z.T. kristallinen Fibrillen aus Cellulose und einer amorphen Grundsubstanz (Matrix). Die Matrix besteht aus Hemicellulosen, Pectin und Glycoproteinen. Sie ist aufgrund der zahlreichen polaren und sauren Gruppen sehr hydrophil. Ihre Bestandteile haben zum großen Teil eine starke Assoziationstendenz und bilden deshalb sowohl untereinander, als auch mit den Cellulosefibrillen ein Netzwerk aus.

Unter den gelöst vorkommenden Bestandteilen der Matrix müssen vor allem Oligosaccharide, Phytohormone, Lectine, Monolignole und Enzyme genannt werden. Zu den Enzymen die bisher in der Zellwand gefunden wurden gehören Peroxidasen, Invertasen, Cellulasen, saure Phosphatase, Pectinasen, Exoglucosidasen, Malatdehydrogenasen und Methylesterasen [BRETT und WALDRON, 1996].

Detailliertere Angaben über den Aufbau der Zellwand finden sich in der Literatur beispielsweise bei KLEINIG und SITTE [1986], BRETT und WALDRON [1996] oder STRASBURGER [1998].

Der Porendurchmesser in Zellwänden liegt im allgemeinen in einem Bereich zwischen 3,5 und 5,5 nm. Kleine Moleküle können nicht lignifizierte, hydrophile Zellwände leicht durchdringen, sofern sie nicht durch elektrostatische Kräfte oder andere Formen der Wechselwirkung mit den Polymeren der Zellwand daran gehindert werden. Saccharose, Pflanzenhormone und die meisten Aminosäuren sind frei beweglich, bei kleinen Proteinen und Polysacchariden ist dies ebenfalls möglich. Die Grenze für die freie Beweglichkeit von Proteinen liegt in der Regel zwischen 10 000 und 50 000 Dalton, bei spezialisierten Zellen können jedoch auch größere Proteine die Zellwand durchdringen [BRETT und WALDRON, 1996].

4.1.1 Der Interzellularraum

Bei der Betrachtung des Apoplasten war zunächst das durchschnittliche Volumen des Interzellularraumes (IZR-Volumen) der Blätter der jeweiligen Baumart von Interesse, da

dessen Größe sowohl für den Gasaustausch mit der Umwelt, als auch für die Gewinnung der Interzellulären Waschflüssigkeit von Bedeutung ist.

In der Tabelle 8 sind die Spannbreiten dargestellt, in denen 90% aller Einzelwerte lagen, die mit Hilfe der beschriebenen Infiltrationsmethode bei den Pflanzen im Immissionsstreß-Versuch gemessen wurden. Die Bezugsbasis bildet entweder die Blattfrischmasse, die Blattfläche oder das Blattvolumen. Die verschiedenen Versuchsvarianten blieben dabei zunächst unberücksichtigt.

Der prozentuale Anteil des Interzellularraumes am Blatt wurde berechnet, indem die Frischmasse des infiltrierten Blattes gleich 100% gesetzt und die Masse des infiltrierten Wassers als prozentualer Anteil hiervon ermittelt wurde.

Tabelle 8: Übersicht über die Interzellularraum-Volumina der im Rahmen des Immissionsstreß-Versuches untersuchten Baumarten. In der Tabelle sind die Bereiche angegeben, in denen 90% aller Einzelwerte lagen ($n \geq 70$). Die Daten der verschiedenen Versuchsvarianten wurden für diese Übersicht zusammengefaßt.

Baumart	Interzellularraum-Volumen		
	[$\mu\text{l} / \text{g}$ Frischmasse]	[$\mu\text{l} / \text{cm}^2$ Blattfläche]	[% des Blattvolumens]
<i>Fagus sylvatica</i>	110 – 270	0,9 – 2,1	9 - 23
<i>Betula pendula</i>	170 – 370	2,5 – 4,9	15 – 27
<i>Sorbus aucuparia</i>	160 - 330	1,9 – 4,2	14 – 25

Die Blätter von *Betula pendula* besaßen demnach das größte IZR-Volumen. Nur wenig kleiner war das Volumen der Interzellularräume bei *Sorbus*-Blättern, während das IZR-Volumen der Buchenblätter aus dem OTC-Versuch deutlich geringer war. Die Blätter des zusätzlich beprobten *Fagus*-Altbaumes und der Buchen aus den Gewächshaus-Versuchen hatten im Vergleich dazu mit 160 bis 270 $\mu\text{l} / \text{g}$ FM (ebenfalls 90% der Einzelwerte) etwas größere IZR-Volumina. Die Werte lagen aber dennoch in der in Tabelle 10 für *Fagus* angegebenen Spannbreite.

Verglichen mit den bei PFANZ [1987] ermittelten Daten von 12 Pflanzenarten, die eine Spannbreite von 130 (bei *Musa textilis*) bis 682 μl (bei *Spinacia oleracea*) pro g Frischmasse aufwiesen, lagen die für Birke und Eberesche ermittelten IZR-Volumina etwa im mittleren Bereich, während die für *Fagus* erhaltenen Werte eher im unteren Bereich einzuordnen sind und den IZR-Volumina von Nadeln nahe kommen. Eigene Vergleichsmessungen ergaben z.B. für Licht-Nadeln von *Abies alba* etwa 150 bis 165 $\mu\text{l} / \text{g}$ FM und für *Pinus sylvestris* 105 bis 110 $\mu\text{l} / \text{g}$ FM.

Bei den Buchen in den Gewächshaus-Versuchen betrug der prozentuale Anteil des Interzellularraumes am Blattvolumen zwischen 14% und 19% und bei den Blättern des *Fagus*-Altbaumes lagen diese Werte zwischen 17 und 21%

Unter der Annahme, daß die Dichte des Blattgewebes etwas höher als die des Wassers anzusetzen ist, kann davon ausgegangen werden, daß der Anteil des IZR-Volumens tatsächlich etwas größer ist.

Zur Berechnung des Anteiles des Interzellularraumes am Blattvolumen auf einem zweiten Weg wurden das IZR-Volumen pro cm^2 Blattfläche und die anhand der REM-Aufnahmen erhobenen Meßdaten zur Blattdicke und damit zum Blattvolumen pro cm^2 Blattfläche

zugrundegelegt. Mit dieser Vorgehensweise wurden für *Fagus* knapp 14%, für *Sorbus* 21% und für *Betula* rund 32,5% ermittelt. Allerdings sind die Messungen an den REM-Aufnahmen zwangsläufig mit Ungenauigkeiten behaftet, da die auf den Fotografien abgebildeten Ausschnitte im Verhältnis zum gesamten Blatt klein sind und die Schnitt-Ebene der Blätter nicht in jedem Falle genau mit der Ebene der fotografischen Abbildung übereinstimmt, so daß die auf diesem Weg erhaltenen Ergebnisse nur angenäherte Werte darstellen können. Die ermittelten Volumenanteile liegen aber, abgesehen von dem etwas höheren Wert bei *Betula*, in den in Tabelle 8 genannten Größenordnungen und auch von anderen Autoren wurden ähnliche Angaben gemacht. Beispielsweise ermittelten SMITH und FOX [1975] bei *Citrus*-Blättern ein Interzellularraum-Volumen von rund 20% des Blattvolumens. PITMAN et al. [1974] nannten für *Hordeum vulgare* nach mikroskopischer Analyse einen Wert von 19% und GAFF und CARR [1961] gaben 24% für *Eucalyptus globulus* an.

Abgesehen von den Unterschieden in der Größe des Interzellularraumes, ähneln sich die Blätter von Buchen, Birken und Ebereschen in den wesentlichen Aspekten ihres inneren Aufbaus weitgehend. Alle drei Baumarten sind in der Lage, phänotypisch an Starklicht adaptierte Blätter mit doppelschichtigem Palisadenparenchym auszubilden. Wie die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen verdeutlichen, sind die Zellen des Palisadenparenchyms wesentlich dichter aneinander gelagert, als die des Schwammparenchyms (Abbildung 6a,b,c). Die Spaltöffnungen befinden sich ausschließlich auf der Blattunterseite. Dieser Fakt und die großen Interzellularräume im Schwammparenchym begünstigen eine starke Verwirbelung der infiltrierten Lösung im Schwammgewebe. Gleichzeitig bedingen die anatomischen Verhältnisse eine erhebliche Verdünnung der aus den Zellwänden herausgelösten Komponenten (vgl. Kap. 4.1.2.1). Dies darf bei der Bewertung der gemessenen Enzymaktivitäten nicht außer Acht gelassen werden.

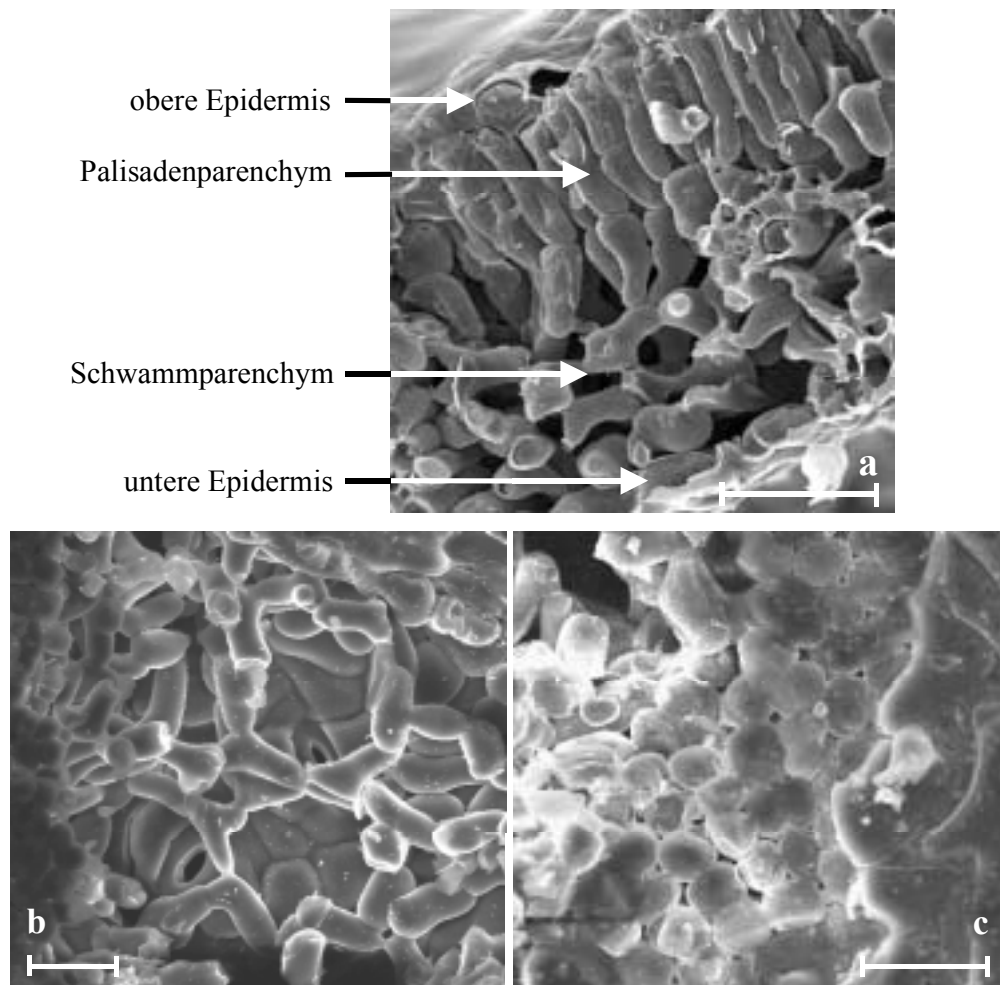


Abbildung 6: REM-Aufnahmen der Blätter von *Sorbus aucuparia* und *Betula pendula*.

Abbildung 6a: Querbruch durch ein Sonnenblatt von *Sorbus aucuparia* (mit zweischichtigem Palisadenparenchym). Die Länge des Balkens entspricht 50 μm .

Abbildung 6b: Aufsicht auf das Schwammparenchym und die darunterliegende untere Epidermis mit Spaltöffnungen (horizontaler Bruch durch ein Blatt von *Betula pendula*). Die Länge des Balkens entspricht 25 μm .

Abbildung 6c: Aufsicht auf die zylindrischen Zellen des Palisadenparenchyms nach partieller Entfernung der oberen Epidermis bei einem Blatt von *Betula pendula*. Rechts im Bild sind noch die ineinander verzahnten Epidermiszellen erkennbar. Die Länge des Balkens entspricht 25 μm .

4.1.2 Die Zellwand

4.1.2.1 Das Zellwandvolumen der Blattzellen

Die Frage nach dem Volumenanteil der Zellwände am gesamten Blatt ergibt sich nach den oben angeführten Gesichtspunkten zwangsläufig, um die in der IWF enthaltene enzymatische Aktivität besser bewerten zu können.

Das tatsächliche Zellwandvolumen ist allerdings nur schwer bestimmbar. In Anlehnung an eine von PFANZ [1987] beschriebene Methode wurde deshalb der Volumenanteil der Zellwand an der Zelle näherungsweise abgeschätzt und der Anteil des Zellwandvolumens am Blattvolumen überschlagsweise kalkuliert.

Anhand der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Messungen der Blattdicken, Zellgrößen und Zellwanddicken durchgeführt (vgl. Kap 3.11) und für die Kalkulation der Volumina eingesetzt. Diese erfolgte auf der Grundlage einer Vereinfachung der Zellformen auf die geometrischen Körper Kreiszylinder und Kugel und unter Zuhilfenahme des bekannten Interzellularraumvolumens pro cm² Blattfläche.

Diesen Berechnungen zufolge nahm die Zellwand einen Volumenanteil von rund 11,5 bis 15% des gesamten Blattvolumens ein. Aufgrund des geringeren Interzellularraum-Volumens wurde der höchste Wert für das Zellwandvolumen bei *Fagus* berechnet (~15%), während für *Betula* mit etwa 11,5% der niedrigste Wert ermittelt wurde. Für *Sorbus* wurde ein Wert von rund 13,5% erhalten.

Der berechnete Anteil der Zellwände an den Zellen betrug für alle drei Baumarten etwa 17%. Bei der Betrachtung dieser Werte muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Berechnungen sowohl durch das Zugrundelegen einfacher geometrischer Körper, die den natürlichen Verhältnissen nur zum Teil entsprechen, als auch durch mögliche Meßungenauigkeiten nur Näherungen darstellen. Zudem gingen die Zellwände des Leitgewebes nicht adäquat in die Berechnung ein.

Die Resultate der Berechnungen liegen aber in Bereichen, die auch von verschiedenen anderen Autoren publiziert wurden. Allerdings sind die Ergebnisse nur schwer vergleichbar, da die Autoren sowohl verschiedene methodische Herangehensweisen hatten, als auch teilweise unterschiedliche Terminologien verwendeten.

Beispielsweise gaben GAFF und CARR [1961] für *Eucalyptus globulus* ein Zellwandvolumen von knapp 13% des Blattvolumens an, während CROWDY und TANTON [1970] den bei ihnen als „free space“ bezeichneten Raum in Weizenblättern mit 3 bis 5% bezifferten. PFANZ [1987] hat Zellwandvolumina zwischen 7 und 9% (für *Nicotiana*, *Spinacia* und *Hordeum*) bis maximal 27% (für *Citrus* und *Musa*) des Blattvolumens angegeben. Legt man die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte zugrunde, um eine Aussage über den Verdünnungsfaktor der IWF zu erhalten, so ergibt sich bei einem Interzellularraum-Volumen von rund 20% des Blattvolumens und bei einem Zellwandvolumen von rund 12-13% ein Faktor von 2,5 bis 2,7. Da aber angenommen werden muß, daß lediglich Bestandteile der gelartigen Zellwandmatrix herausgelöst werden können, müßte der Anteil der Matrix-Phase an der gesamten Zellwand zugrundegelegt werden. Der Matrix-Anteil ist jedoch ausgesprochen schwer kalkulierbar, da er variabel ist und vom Entwicklungszustand der Zellwand abhängt. Würde man von einem Matrix-Anteil von mindestens 40% ausgehen (entspricht 4,8 – 5,2% Zellwandvolumen im Vergleich zu ursprünglich 12 – 13%), so ergäbe sich insgesamt ein Verdünnungsfaktor von etwa 5. Entsprechend den oben angeführten Zahlenwerten hinsichtlich der Interzellularraum- und Zellwandvolumina ist anzunehmen, daß die aus Birkenblättern isolierte IWF die am stärksten verdünnte Lösung darstellt, während die IWF aus Blättern von *Fagus* am konzentriertesten war.

4.1.2.2 pH-Wert der Zellwandphase

Die Zellwände haben, aufgrund des Überwiegens der Uronsäurereste (v.a. Galacturonsäure der Pectine in Primärwänden und Glucuronsäure der Xylane in Sekundärwänden), normalerweise eine negative Nettoladung an der stationären Phase. Die negativen Ladungen werden partiell durch positiv geladene Proteine ausgeglichen. Weitere Gegenionen sind v.a. Calcium-Ionen und Protonen [BRETT und WALDRON, 1996].

Die Messungen des pH-Wertes der IWF ergaben bei allen drei Baumarten Werte zwischen 6,1 und 6,7. Da die Infiltrationslösung ungepuffert war und ursprünglich einen pH-Wert um 5,0 hatte, ist anzunehmen, daß der pH-Wert der extrahierten IWF denjenigen der Zellwandmatrix repräsentiert. Begünstigt durch die Verwirbelung der Flüssigkeit in den Interzellularen wurden demzufolge vermutlich neben Ionen, niedermolekularen phenolischen Verbindungen und Proteinen auch schwache organische Säuren ausgewaschen. Untersuchungen von LÓPEZ-MILLÁN et al. [2000] an apoplastischer Flüssigkeit, die durch Zentrifugation von *Beta vulgaris*-Blättern gewonnenen wurde, ergaben beispielsweise Citrat-, Malat- und Succinat-Gehalte im millimolaren Bereich.

In der Literatur wird der pH-Wert im Apoplasten mit einer Spannbreite zwischen pH 4 und 7 angegeben, wobei die Mehrheit der untersuchten Pflanzenarten in einem Bereich zwischen pH 5 und 6,5 liegt [z.B. PFANZ und DIETZ, 1987; GRIGNON und SENTENAC, 1991; HOFFMANN et al., 1992; HANSTEIN und FELLE, 1999, OJA et al., 1999]. Die Angaben schwanken hierbei sowohl aufgrund der unterschiedlichen untersuchten Pflanzenarten und Gewebe, als auch bedingt durch den Einsatz verschiedenartiger Meßmethoden (Fluoreszenzmessungen, Messung extrahierter Flüssigkeiten, Einsatz von Mikroelektroden oder Confocaler Laser-Scanning-Mikroskope).

Da die Zellwandphase sich über die Plasmamembran in ständigem Austausch mit dem Cytoplasma befindet und demzufolge nicht als statisches System zu betrachten ist, sollten Veränderungen der Ionengleichgewichte in bestimmten Entwicklungsstadien bei der Betrachtung dieser Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden. Ebenso besteht die Möglichkeit, daß sich aufgrund der Mikroporosität der Zellwand der pH-Wert in bestimmten, eng abgegrenzten Bereichen von den hier angegebenen Werten unterscheidet.

Die *in vivo* bestehenden Milieubedingungen für enzymatische Reaktionen in der Zellwandphase können daher nicht sicher charakterisiert werden.

4.1.3 Interzelluläre Waschflüssigkeit

4.1.3.1 IWF-Ausbeute

Bei der Zentrifugation der Blätter zur Extraktion der IWF wurde beobachtet, daß nur ein Teil der infiltrierten Flüssigkeit wieder zurückgewonnen werden konnte. Wie sich anhand der Dunkelfärbung der Blattbereiche mit flüssigkeitsgefüllten Interzellularen zeigte, verblieb ein großer Teil der Infiltrationslösung in den Blättern. Mit Hilfe des berechneten Interzellularraumvolumens und der Kenntnis über die zur Gewinnung der IWF eingesetzte Blattmasse sowie das daraus isolierte IWF-Volumen, war es möglich eine Aussage über die Effizienz der IWF-Gewinnung zu treffen. Bei *Fagus*- und *Sorbus*-Blättern lag die IWF-

Ausbeute bei durchschnittlich 11-12%, bei *Betula* wurden rund 18% der infiltrierten Lösung als IWF extrahiert. Die Ursache für die etwas höhere IWF-Ausbeute bei Birkenblättern ist vermutlich in blattanatomischen Verhältnissen zu suchen die die Extraktion begünstigen. Dazu gehören beispielsweise der, verglichen mit den beiden anderen Baumarten, etwas lockerere Aufbau des Mesophylls (vgl. Kap. 4.1.1) und die leicht über die Blattoberfläche herausgehobenen Stomata.

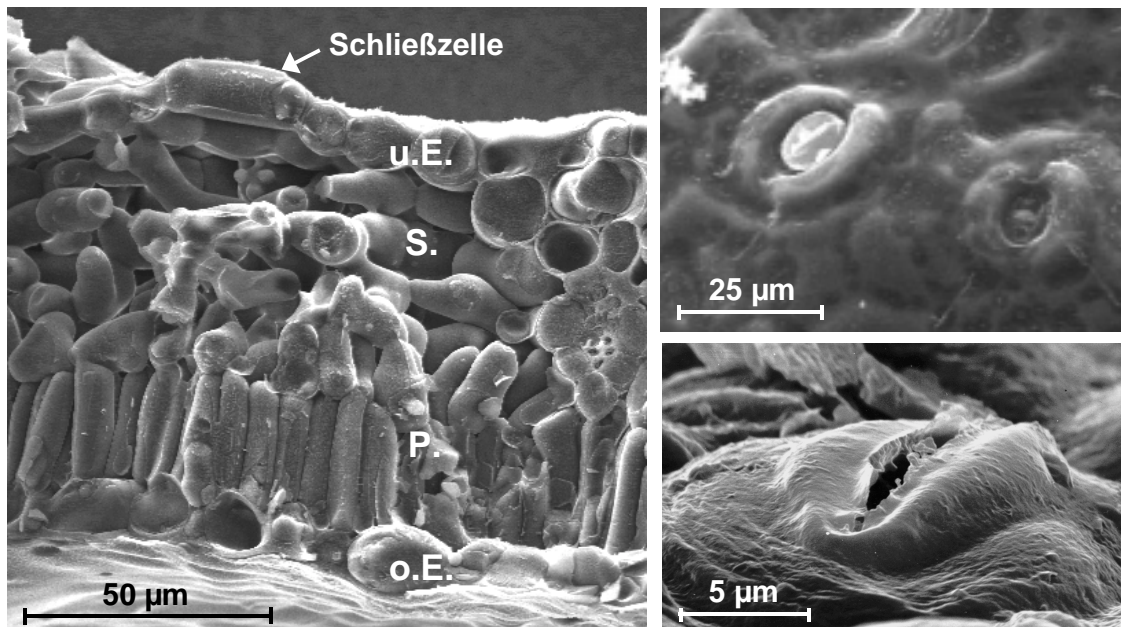


Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Birkenblättern.

links: Querschnitt durch ein Blatt. In der unteren Epidermis (u.E.) wurde eine Spaltöffnung median gebrochen. Eine über die Ebene der Epidermiszellen herausgehobene Schließzelle ist erkennbar.

rechts oben: Aufsicht auf die untere Epidermis mit Spaltöffnungen.

rechts unten: Schräge Aufsicht auf eine Spaltöffnung mit den leicht über die Ebene der anderen Zellen herausgehobenen Schließzellen.

Abkürzungen: o.E. = obere Epidermis, P. = Palisadenparenchym, S. = Schwammparenchym, u.E. = untere Epidermis

4.1.3.2 Proteingehalt der IWF

Die Bestimmung des Proteingehaltes der IWF erwies sich als methodisch schwierig. Die gewonnenen Daten zeigten eine hohe Streuung. Daher wurden zahlreiche Versuche zur Optimierung der Methode (vgl. Kap. 3.7) unternommen. So wurde die Zahl der Ethanol-Reinigungsschritte variiert, eine zusätzliche Reinigung mit DMSO getestet und der Einfluß der Triton®-Konzentration auf die Proteinrücklösung und auf die Farbreaktion selbst überprüft. Auch die Effizienz des Phenolreinigungs-Schrittes mit Polyclar AT® und eine Reinigung der IWF durch Filtration über Mikro-Filtereinheiten (ultrafree MC- Filter, BIOMAX – 10, 10 000 NMWL, Millipore Corporation, U.S.A./ Japan) wurden getestet. In der Mehrzahl der Versuche wurde zum Vergleich HRP als Standard mit bekannter Proteinkonzentration mitgeführt und in einigen Fällen ungereinigte IWF direkt zur Messung eingesetzt.

Alle zusätzlich angewendeten Reinigungsschritte erhöhten jedoch lediglich die Streuung der Ergebnisse. Insbesondere die Anwendung von DMSO erwies sich in dieser Hinsicht als ungünstig, was vermutlich durch die hohe Viskosität des Lösungsmittels begründet war.

Das ursprüngliche Färbeverfahren mit dem BCA-Testkit der Firma Pierce („Micro BCA Protein Assay Reagent Kit“, Fa. Pierce, Rockford, U.S.A.) wurde nach einem Vergleich mit einem selbst hergestellten BRADFORD-Reagenz [BRADFORD, 1976] und dem von der Firma ROTH (Karlsruhe) angebotenen Roti[®]-Nanoquant (welches ebenfalls auf dem BRADFORD-Prinzip beruht) durch letzteres abgelöst.

Die Verwendung von Polyclar AT[®] wurde beibehalten, da offenbar Ferulasäure (und vermutlich auch verwandte Substanzen) mit dem BRADFORD-Reagenz angefärbt und daher fälschlich als Protein detektiert werden. Durch die Bindung dieser Substanzen an Polyclar AT[®] konnten solche falsch positiven Ergebnisse verhindert werden.

Trotz der genannten Optimierungsversuche konnte die starke Streuung der Meßwerte bei Mehrfachbestimmungen nicht verringert werden. Die geringen Probenvolumina spielten dabei sicherlich ebenso eine Rolle wie die unverzichtbare, trotz der Vereinfachung des Verfahrens noch relativ aufwendige Ausfällungs- und Reinigungsprozedur der Proteine.

Die Streuung der Meßwerte erschwerte vergleichende Aussagen zwischen verschiedenen Behandlungsvarianten oder Probenahmezeitpunkten und ließ es nicht sinnvoll erscheinen, die Proteindaten als Bezugsbasis für die Peroxidase-Umsatzraten zugrunde zu legen.

Über den Proteingehalt der Proben lassen sich demzufolge nur verallgemeinerte Aussagen treffen. Die IWF Proben enthielten in der Regel etwa zwischen 100 und 300 µg/ml Protein. Zwischen den verschiedenen Baumarten wurden keine deutlichen Unterschiede festgestellt.

Länger andauernde, sich langsam aufbauende Streßsituationen wie Trockenheit oder eine Belastung mit Luftschadstoffen veränderten den Proteingehalt im Apoplasten, während die akute, kurzzeitige Streßsituation bei Blattverwundung keine Veränderungen hervorrief. Auf die Veränderungen unter Immissionsbelastung und Trockenstreß wird in den entsprechenden Kapiteln (Kap. 4.3.11 und 4.4.3) näher eingegangen.

4.1.4 Zusammenfassung

Mit Hilfe der vorgestellten Ergebnisse konnte eine genauere Charakterisierung des Blatt-Apoplasten der drei zu untersuchenden Baumarten vorgenommen werden.

Bei den Blättern von *Betula pendula* wurde dabei das größte Interzellularraum-Volumen (~15 bis 27% des Blattvolumens) und das geringste Zellwandvolumen (~11,5% des Blattvolumens) festgestellt. Die Blätter von *Fagus sylvatica* besaßen dagegen das geringste IZR-Volumen (~9 – 23% des Blattvolumens) und das größte Zellwandvolumen (~15% des Blattvolumens). Bei *Sorbus aucuparia* betrug das IZR-Volumen rund 14 – 25% des Blattvolumens und die Zellwand nahm etwa 13,5% des Blattvolumens ein.

Diesen Ergebnissen zufolge war die aus den Blättern gewonnene IWF bei *Fagus* die am geringsten und bei *Betula* die am stärksten verdünnte Lösung der Zellwandbestandteile.

Der pH-Wert der Zellwandphase lag bei allen drei Baumarten im schwach sauren Bereich, zwischen pH 6,1 und 6,7. Die IWF-Ausbeute war bei *Betula* mit rund 18% der ursprünglich infiltrierten Lösung am höchsten, während bei *Fagus* und *Sorbus* nur rund 11-12% der infiltrierten Lösung durch die Zentrifugation der Blätter zurückgewonnen werden konnten.

Der Proteingehalt der IWF lag zwischen 100 und 300 µg/ ml.

4.2 Grundlegende Untersuchungen zur Peroxidaseaktivität im Apoplasten

4.2.1 Methodenoptimierung für die *in vitro*-Messungen - Optimale Substratkonzentrationen bei der Sulfitoxidation

Wie im Kapitel 3.6 bereits erwähnt, mußten die für Zellwand-Peroxidasen aus anderen Pflanzenarten bekannten, bzw. bei ersten Versuchen mit *Fagus*-IWF verwendeten Meßansätze [vgl. OPPMANN, 1990, PFANZ und OPPMANN, 1991 und PFANZ 1993] zur *in vitro* Bestimmung der Sulfit- und IAA-Oxidation für die untersuchten Baumarten optimiert werden. Es wurden daher verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, um optimale Umsatzraten zu erreichen. Hierbei zeigte sich, daß im Vergleich zu Nadelbaum-Peroxidasen eine deutliche Steigerung der Substratkonzentrationen notwendig war, um im Bereich maximaler Umsatzraten der Laubbaum-Peroxidasen zu arbeiten.

In der Tabelle 9 sind die optimalen Substratkonzentrationen für die Sulfitoxidationsreaktion von Peroxidasen aus Nadelbaum-IWF und Laubbaum-IWF gegenübergestellt und die in der vorliegenden Arbeit getesteten Konzentrationsbereiche angegeben.

Die ermittelten Optimalkonzentrationen unterschieden sich bei den drei Laubbaumarten grundsätzlich nicht (vgl. Tabelle 5 in Kap. 3.6.1). Aus diesem Grunde erfolgen in der Tabelle 9 allgemeine Angaben zu den Substratkonzentrationen:

Tabelle 9: Gegenüberstellung der optimalen Substratkonzentrationen bei der Sulfitoxidation durch Fichten-Peroxidasen und Laubbaum-Peroxidasen

	Konzentrationen [mM]		
	H ₂ O ₂	Ferulasäure	Na ₂ SO ₃
Sulfitoxidation durch Peroxidasen aus Fichtennadel-IWF [OPPMANN, 1990]	0,1	0,05	1
überprüfte Konzentrationsbereiche	0,05 - 0,5	0,05 - 1	0,5 - 5
Ermittelte Optimalkonzentrationen für die Sulfitoxidation durch Peroxidasen aus Buchen-, Birken- und Ebereschen-IWF	0,2 - 0,25	0,25 - 0,35	1,5

Die Natriumsulfitkonzentration im Standardansatz wurde im Ergebnis der Versuche zur Methodenoptimierung auf 1,5 mM festgelegt, da das Substrat einer Autoxidationsreaktion unterlag. Oberhalb dieser Konzentration beeinträchtigte die rasche Sauerstoffzehrung in der Meßzelle in Folge dieser Autoxidation die exakte Messung der Peroxidasereaktion.

Die Sulfitoxidationsraten wurden in jedem Falle zum Zeitpunkt der höchsten Reaktionsgeschwindigkeit am Beginn der Reaktion bestimmt.

4.2.2 Methodenoptimierung für die *in vitro*-Messungen - Optimale Substratkonzentrationen bei der IAA-Oxidation

Die bei der Oxidation von IAA verwendeten Substratkonzentrationen wurden ebenfalls im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Meßansätzen erhöht, um im Bereich maximaler Umsatzraten zu arbeiten. Die Tabelle 10 stellt die bei früheren Untersuchungen angewendeten Substratkonzentrationen [PFANZ, 1993] und die in dieser Arbeit ermittelten Sättigungsbereiche für die Versuchspflanzen dar.

Tabelle 10: Substratkonzentrationen bei der IAA-Oxidation - Gegenüberstellung der aus der Literatur bekannten Daten und der ermittelten Optimalkonzentrationen für Zellwand-Peroxidasen aus den Blättern der drei Laubbaumarten.

	Konzentrationen [mM]		
	H ₂ O ₂	Cumarsäure	IAA
Bei früheren Versuchen angewendete Substratkonzentrationen (Fichten-, Gersten- und Buchen-IWF [PFANZ, 1993])	0,7	0,8	0,2
getestete Konzentrationsbereiche	0,1 – 2,5	0,001 - 10	0,2 - 16
Ermittelte Optimalkonzentrationen für die IAA-Oxidation durch Peroxidasen aus Buchen-, Birken- und Ebereschen-IWF	1 - 1,25	7 - 9	12 - 14

Mit den Angaben in den beiden Tabellen wird deutlich, daß bei den im Rahmen dieser Untersuchungen vorgenommenen Messungen mit vergleichsweise hohen Substratkonzentrationen gearbeitet wurde. Die eingesetzte IWF-Menge war zudem relativ gering (vgl. Kap. 3.6.2). Das Anliegen der hier durchgeführten Versuche war es jedoch, Standardbedingungen zu bestimmen, bei denen eine gute Meßbarkeit der Umsatzraten gegeben ist und die eine Vergleichbarkeit der gemessenen Umsatzraten zwischen den verschiedenen Varianten und Probenahmezeitpunkten gewährleisten. Dies konnte mit den hier dargestellten Testansätzen erreicht werden. Die *in vivo* im Apoplasten vorkommenden Konzentrationen der verwendeten Substrate standen daher beim Aufbau des Enzym-Meßansatzes nicht im Vordergrund. Ohnehin ist deren Bestimmung problematisch, so daß kaum Messungen hierzu bekannt sind. Zudem sind die natürlichen Verhältnisse durch die Mikroporosität der Zellwand, die Präsentation geladener Gruppen an der Oberfläche von Zellwandbausteinen und die Veränderlichkeit der Konzentration freier Ionen gekennzeichnet. Durch die *in vitro* Messungen wurde demzufolge ein Umsatzpotential der Peroxidasen für Sulfit und IAA bei optimierten Konzentrationen natürlich vorkommender Substrate bestimmt.

4.2.3 Zusammensetzung, pH-Wert und Einwirkungszeit der Infiltrationslösung

Zur Überprüfung methodischer Aspekte bei der Extraktion der apoplastischen Peroxidasen wurden einige Versuche zur Handhabung der infiltrierten Blätter und zur Zusammensetzung der Infiltrationslösung an Buchenblättern unternommen. Von Interesse waren hierbei vor allem die Auswirkungen veränderter KCl- und CaCl_2 -Konzentrationen und einer Verschiebung des pH-Wertes der Lösung. Ebenso sollte der Einfluß der Einwirkungszeit der Infiltrationslösung in den Blättern untersucht werden.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- 1) Werden durch eine modifizierte Ionenkonzentrationen in der Infiltrationslösung die Bindungsverhältnisse der Peroxidasen im Apoplasten beeinflusst, so daß sich die Enzymmenge in der IWF ändert?
- 2) Verändert sich unter diesen Bedingungen die Zahl der Peroxidase-Isoformen in der IWF?
- 3) Verbessert eine Verlängerung der Einwirkungszeit der Infiltrationslösung den Austausch zwischen der infiltrierten Lösung und der Zellwandphase und erhöht sich damit die Menge isolierbarer Enzyme?

4.2.3.1 Einfluß der Ionenkonzentration in der Infiltrationslösung auf die in der IWF enthaltenen Peroxidasen

Bei den Versuchen zur Ionenkonzentration in der Infiltrationslösung wurde die CaCl_2 -Konzentration zunächst in einem Bereich zwischen 1 und 50 mM variiert. In einem später durchgeführten Versuch wurden der Infiltrationslösung 200 bzw. 250 mM CaCl_2 zugesetzt. Im Rahmen dieses zweiten Versuchs wurde teilweise auch die KCl-Konzentration von 4 mM im üblichen Ansatz auf 200 bzw. 250 mM erhöht (vgl. Kap. 3.9.1).

Die Resultate der Messungen der Sulfitoxidationsraten sind in Abbildung 8 und Abbildung 9 dargestellt. Da die Versuche mit hohen CaCl_2 - und KCl-Konzentrationen zu einem deutlich späteren Zeitpunkt in der Vegetationsperiode durchgeführt wurden, war aufgrund einer jahreszeitlich bedingt höheren Peroxidaseaktivität (vgl. Kap. 4.3.9.1) kein direkter Vergleich mit den zuerst erhobenen Daten möglich. Die gemessenen Umsatzraten wurden daher nur mit den jeweils zum gleichen Zeitpunkt ermittelten Kontrollwerten verglichen.

Bei einer leicht erhöhten CaCl_2 -Konzentrationen von 5 mM (Standardansatz: 1 mM CaCl_2) wurden um 20 - 40% erhöhte Umsatzraten beobachtet, während es bei 10 mM CaCl_2 nur noch 7 - 8% waren. Der Unterschied zwischen dem Standardansatz und dem Ansatz mit 5 mM CaCl_2 war signifikant (U-Test, $p = 0,023$). Bei Konzentrationen im Bereich zwischen 15 und 250 mM CaCl_2 waren die Umsatzraten niedriger als bei den vergleichbaren Kontrollen. Insbesondere bei 200 bzw. 250 mM sanken die Sulfitoxidationsraten drastisch um rund 65% ab. Alle Unterschiede waren signifikant (U-Test: bei 15 mM CaCl_2 $p = 0,034$, bei allen anderen Konzentrationen $p < 0,001$). Bei deutlich erhöhten KCl-Konzentrationen in der Infiltrationslösung wurden nur noch ca. 30% des Umsatzes der Kontrollen gemessen (Signifikanzniveau des Unterschiedes zur Kontrolle bei beiden KCl-Konzentrationen nach U-Test: $p < 0,001$).

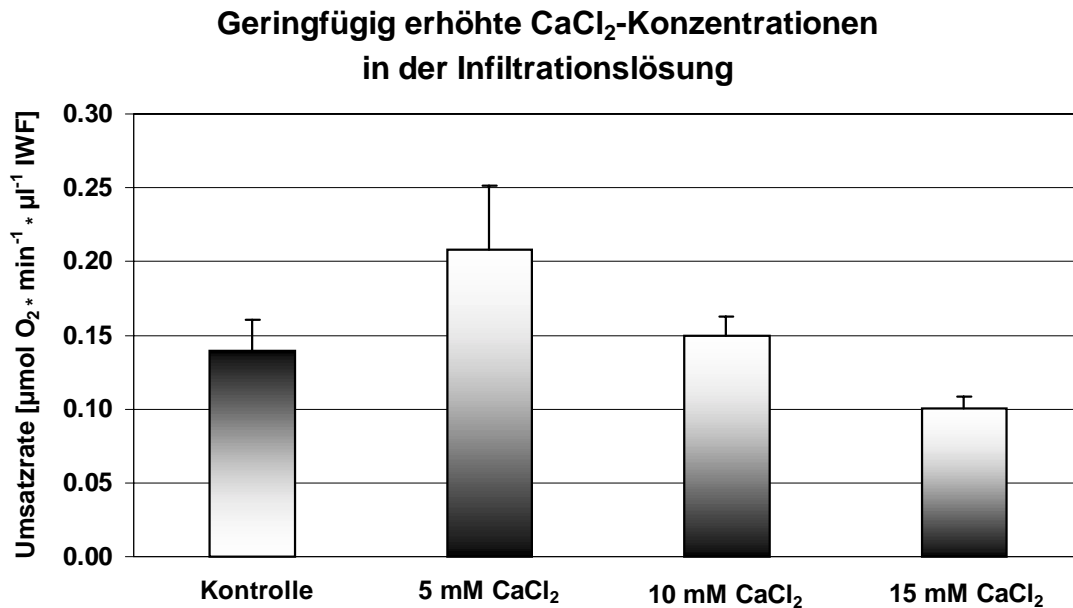


Abbildung 8: Einfluß erhöhter CaCl_2 Konzentrationen in der Infiltrationslösung auf die in der IWF enthaltenen sulfitoxidierenden Peroxidasen. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte der *in vitro* bestimmten Umsatzraten bei der Sulfitoxidation ($n = 3 - 8$).

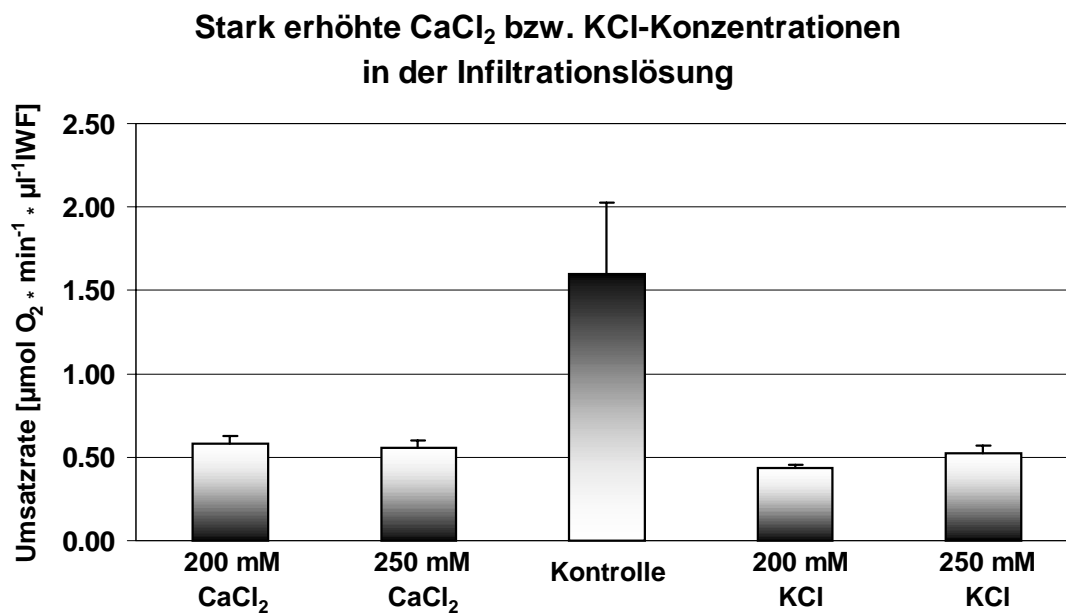


Abbildung 9: Einfluß deutlich erhöhter CaCl_2 - und KCl -Konzentrationen in der Infiltrationslösung auf die in der IWF enthaltenen Peroxidasen. Dargestellt sind die Mittelwerte der *in vitro* bestimmten Sulfitoxidationsraten ($n = 8$).

Die isoelektrische Fokussierung der Peroxidaseproteine auf Polyacrylamid-Gel sollte Aufschluß über die Zahl der mit der IWF isolierten Enzym-Isoformen geben.

Bei der Auftragung der IWF auf Polyacrylamid-Gel wurde ein Muster aus etwa 14 Banden mit Peroxidaseaktivität erhalten.

Davon wurden 4-5 Banden im sauren Bereich (pH 3 bis pH 5, anodisch), 6-7 im schwach sauren bis neutralen Bereich (pH 5 bis pH 7) und 2-3 Banden im basischen Bereich (etwa pH 8 - 8,5, kathodisch) detektiert. Die höchste Intensität der Färbung und damit die bei weitem größten Peakflächen im Densitogramm wiesen die Banden im sauren pH-Bereich auf.

Beim Vergleich zwischen den Behandlungen mit hohen CaCl_2 - und KCl -Konzentrationen und dem Kontrollansatz wies das Gel keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Zahl der detektierbaren Isoformen aus (Abbildung 10). Bei Betrachtung der Densitogramme (Abbildung 11) erscheint es jedoch bemerkenswert, daß im Bereich der sauren und schwach sauren Peroxidasen unter dem Einfluß der hohen Ionenkonzentrationen teilweise eine Verschiebung der Größenverhältnisse der einzelnen Peaks zueinander zu verzeichnen war. Zudem wurden zwei in der Kontrolle sehr dicht beieinander liegende Isoformen bei diesen Proben nicht mehr aufgetrennt (Peak Nr. 6 und 7). Die Densitogramme wiesen in diesem Bereich und bei Peak Nr. 10 (schwach sauer) besonders bei 250 mM CaCl_2 , aber auch bei 200 mM CaCl_2 verminderte Peakhöhen aus. Bei den KCl -Varianten wurde bei Peak Nr. 10 die Ausbildung einer Schulter festgestellt, die darauf hinweist, daß sich hier möglicherweise zwei Isoformen des Enzyms mit sehr ähnlichen isoelektrischen Punkten im Gel befanden, die aufgrund der Modifikation der Proteine durch die hohen KCl -Konzentrationen nun deutlicher hervortraten.

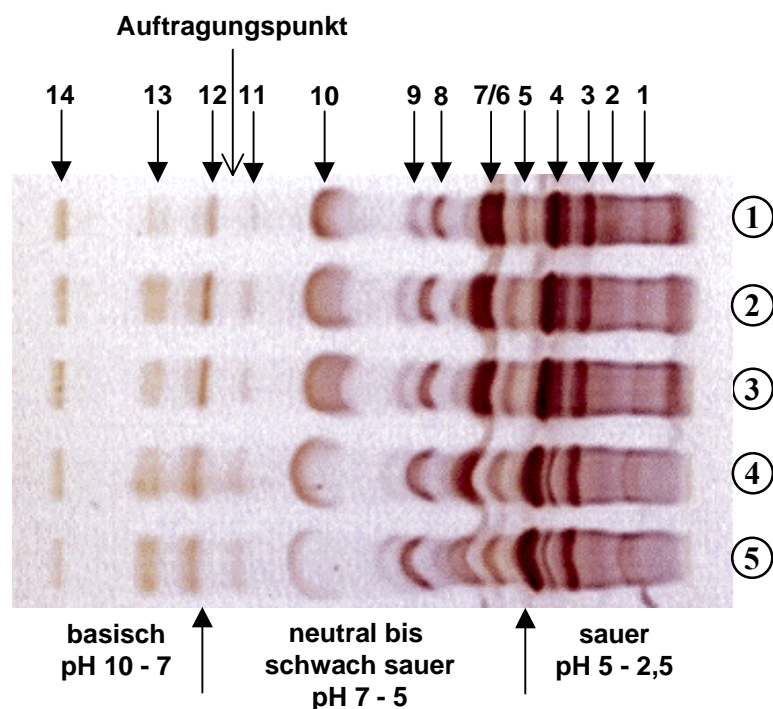


Abbildung 10: Einfluß von hohen CaCl_2 - und KCl -Konzentrationen in der Infiltrationslösung auf die Bandenmuster der apoplastischen Peroxidaseproteine nach isoelektrischer Fokussierung auf einem Polyacrylamid-Gel und Färbung mit Guajacol und Benzidin. Die Numerierung der Bahnen entspricht der in Abbildung 10 verwendeten Numerierung.

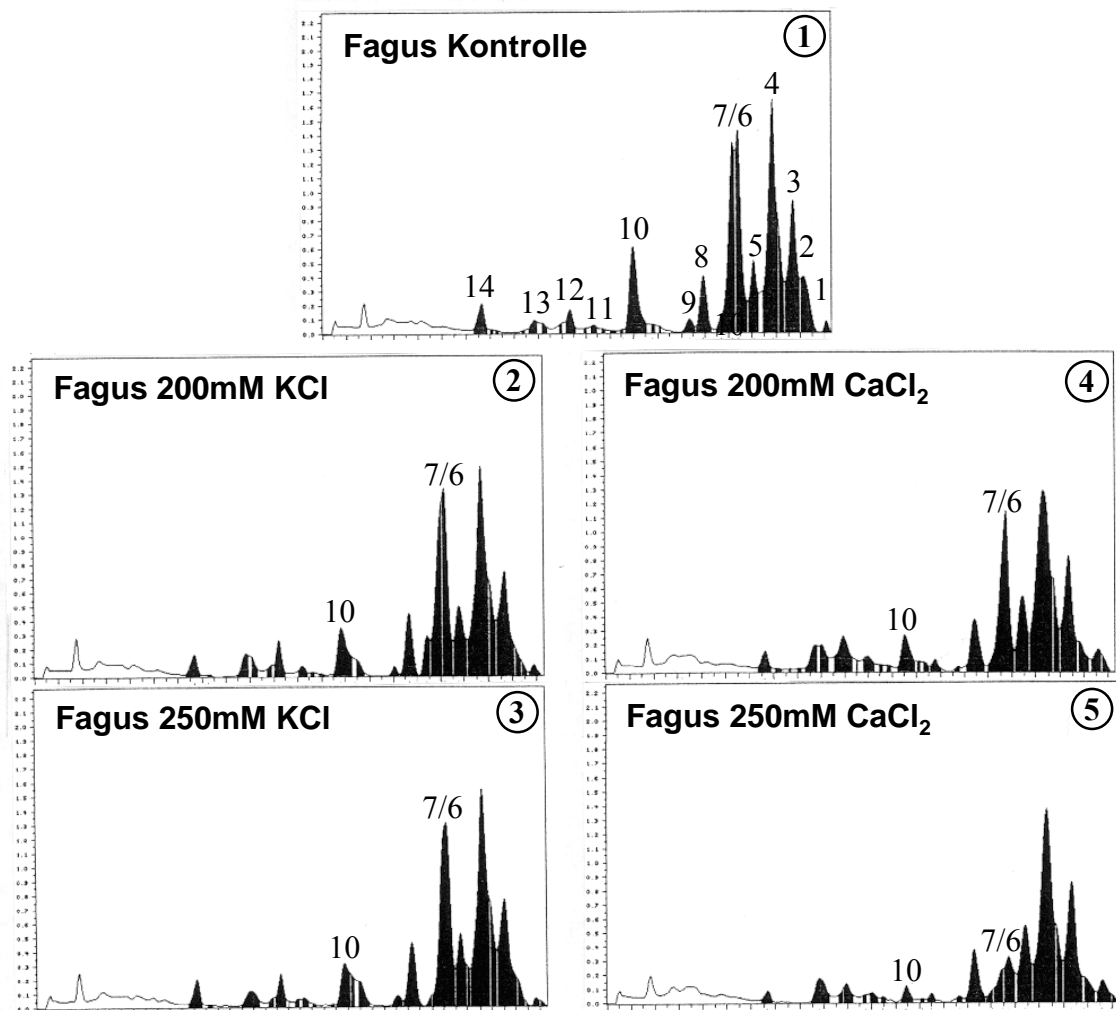


Abbildung 11: Densitogramme der in Abbildung 10 dargestellten Bandenmuster. Numerierung der Peaks entsprechend Abbildung 10.

Hinsichtlich des Wanderungsverhaltens der Peroxidaseproteine in Polyacrylamid-Gelen wurden insbesondere von MÄDER et al. [1975 und 1976] umfassende Artikel publiziert. Diese Autoren fanden bei verschiedenen Tabak-Geweben nach elektrophoretischer Trennung vier durch Wanderungsrichtung und -geschwindigkeit deutlich voneinander abgegrenzte Gruppen von Peroxidasen. Es handelte sich dabei um eine schnell und eine langsam wandernde anodische Gruppe (GI und GII) sowie eine langsam und eine schnell wandernde kathodische Gruppe (GIII und GIV). Die Peroxidasen der Gruppen GI – GIII kamen in der Zellwand von Blättern vor. Die Isoformen der Gruppe GI wurden als lösliche, diffusible Peroxidasen bezeichnet, während diejenigen der Gruppe GII erst nach enzymatischer Behandlung der Zellwände mit Cellulase und Pektinlucosidase extrahierbar waren und damit als kovalent gebunden eingestuft wurden. Die kathodische Gruppe GIII war ionisch gebunden, da sie erst bei Behandlung der Zellwände mit 1M NaCl extrahiert werden konnte. CASTILLO et al. [1984a] konnten bei Infiltration der Blätter von *Sedum album* dagegen bereits mit 100 mM KCl die ionisch gebundenen extrazellulären Peroxidasen herauslösen. MCDUGALL und MORRISON [1995] erreichten durch Infiltration einer 100 mM CaCl_2 enthaltenden Lösung bei *Linum usitatissimum* die Lösung der ionisch gebundenen Peroxidasen.

Es war demnach zu erwarten, daß bei den Versuchen mit den hohen KCl- und CaCl₂-Konzentrationen zumindest ein Teil der ionisch gebundenen Peroxidasen aus dem Apoplasten extrahiert wurde. Dementsprechend müßte aber auch davon ausgegangen werden, daß bei der üblichen Infiltrationsmethode die Ionenstärken zu gering gewesen wären, um außer den löslichen, frei diffusiblen Peroxidasen auch gebundene Isoformen mit herauszulösen. Die Ähnlichkeit der Bandenmuster zwischen der Kontrolle und den Varianten mit hoher Ionenkonzentration in der Infiltrationslösung ist somit ein unerwartetes Ergebnis.

In der Darstellung von MÄDER et al. [1975] entsprach die Gruppe der ionisch gebundenen Peroxidasen der langsam wandernden kathodischen Gruppe GIII. Im Bereich oberhalb 7,0 waren jedoch bei allen fünf im vorliegenden Versuch aufgetragenen Proben in nahezu gleichem Maße nur zwei schwach ausgeprägte Banden erkennbar (Nr. 13 und 14). Die Zahl und Ausprägung der Banden im neutralen bis basischen (kathodischen) Bereich war insgesamt wesentlich geringer als die im sauren (anodischen) Bereich. Dies entspricht dem von anderen Autoren in Zellwänden gefundenen Verteilungsmuster [z.B. CASTILLO et al., 1984a; ROS BARCELÓ et al., 1988, BOEUF et al., 1999]. Hinsichtlich der Wanderungsrichtung ionisch gebundener Peroxidasen wurden bei verschiedenen Untersuchungen sehr unterschiedliche Resultate erhalten. Konträr zu den Aussagen von MÄDER et al. [1975] wurden bei ROS BARCELÓ et al. [1988] ionisch gebundene Peroxidasen aus Zellwänden von *Lupinus albus* (mit 1 M KCl gelöst) im sauren Bereich detektiert. CASTILLO et al. [1984a] fanden die ionisch gebundenen Peroxidasen ebenso wie die freien Isoformen überwiegend im sauren Bereich, aber sowohl unter den extrazellulären, freien Peroxidasen, als auch unter den ionisch gebundenen Peroxidasen gab es Isoformen, die weit im basischen pH-Bereich lagen. Auch GOLDBERG et al. [1986] beschrieben nach elektrophoretischer Analyse der Peroxidasen anionische und kationische Formen unter den ionisch gebundenen Enzymen, während alle anderen Fraktionen hauptsächlich anionische Isoformen enthielten.

Welche Isoformen durch die Banden im basischen Bereich des Gels repräsentiert wurde, kann demzufolge nicht eindeutig geklärt werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, daß sowohl im basischen, als auch im neutralen Bereich keine Veränderung des Bandenmusters durch die deutliche Erhöhung der Ionenkonzentration in der Infiltrationslösung bewirkt wurde. Die beschriebenen Veränderungen im anodischen Bereich lassen zudem eher auf eine verschlechterte Extraktion der Peroxidasen unter diesen Bedingungen schließen als auf eine zusätzliche Herauslösung weiterer, durch ionische Wechselwirkungen gebundener Enzyme. Die verminderten Sulfitoxidationsraten bei gleichen eingesetzten IWF-Volumina bestätigen dies. Es ist denkbar, daß durch die Infiltration einer Lösung mit hohem Calciumgehalt die Viskosität des Pectins erhöht wurde, da der Vernetzungsgrad der Pectinbausteine calciumabhängig ist ALBERTS et al. [1990]. Möglicherweise konnten hierdurch weniger Peroxidasen aus der Zellwand herausgelöst werden.

Auch eine direkte Wirkung der hohen Calciumkonzentrationen auf die Peroxidasen selbst ist denkbar. Der physiologische Bereich der Ca-Konzentration liegt nach Aussagen von HEPLER und WAYNE [1985] intrazellulär bei Konzentrationen im Bereich von etwa 0,1 bis 10 µM und im extrazellulären Milieu bei niedrigen millimolaren Konzentrationen. HARTUNG et al. [1988] fanden in der apoplastischen Lösung von Baumwoll-Blättern Ca²⁺-Konzentrationen von 0,83mM und K⁺-Konzentrationen von 4,5 mM. Möglicherweise bewirkten im vorliegenden Versuch die weit oberhalb des physiologischen Bereiches liegenden Ionenkonzentrationen, die nach der Extraktion der IWF nicht aus den Proben entfernt wurden, eine so starke Konformationsänderung der Peroxidaseproteine, daß diese sich hemmend auf die Enzymaktivität auswirkte. Dies könnte sowohl verminderte Sulfitoxidationsraten, als auch

eine verminderte Intensität der Banden bei den aktivgefärbten Gelen zufolge gehabt haben. Allerdings wären dann nur bestimmte Isoformen davon betroffen gewesen.

Die erhöhten Umsatzraten bei CaCl_2 -Konzentrationen von 5-10 mM lassen dagegen auf einen fördernden Effekt der niedrig konzentrierten Ionen schließen. Wie bereits in Kapitel 1.4 angesprochen, ist Calcium einerseits notwendig, um die Proteinstruktur um das aktive Zentrum der Enzyme zu stabilisieren und andererseits um die Sekretion der Peroxidasen in die Zellwandphase zu ermöglichen. Nach PENEL [1986] soll der Transfer (in diesem Falle kationischer Peroxidasen) in die Zellwand durch die Aktivität vermutlich Calcium-abhängiger Rezeptoren und durch die von der cytosolischen Calciumkonzentration abhängigen, sekretorischen Prozesse, bestimmt werden. Am Ort der Funktion soll die Aktivität dieser Enzyme dann von der lokalen Calciumkonzentration beeinflusst sein.

Die Möglichkeit einer rasch gesteigerten Sekretion von Peroxidasen in die Zellwandphase unter dem Einfluß von 5-10 mM CaCl_2 im infiltrierten Medium muß als Ursache für die erhöhten Umsatzraten durchaus in Betracht gezogen werden, da Peroxidasen im Zeitraum von Minuten sekretiert werden können [GASPAR et al., 1985]. Die Zeitspanne von 10-15 min zwischen der Infiltration und der Zentrifugation der Blätter war vermutlich dafür ausreichend. Neu sekretierte Peroxidasen, die mit einer calciumreichen Zellwandphase in Kontakt kommen, sollen nach einer Hypothese von CASTILLO et al. [1984a] durch die Inkorporation des Ions aktiviert werden. Durch Calcium aktivierte Peroxidasen sollen leichter löslich sein und damit durch Vakuuminfiltration extrahierbar werden. Dies würde ebenfalls zur Erhöhung der in der IWF meßbaren Peroxidaseaktivität führen.

4.2.3.2 Auswirkungen eines veränderten pH-Wertes der Infiltrationslösung

Neben den Versuchen zur Wirkung veränderter CaCl_2 - und KCl -Konzentrationen in der Infiltrationslösung sollte auch der Effekt des pH-Wertes, bzw. einer Pufferung der Infiltrationslösung auf die Extraktion der Peroxidasen und ihre Aktivität überprüft werden. Hierfür wurde eine Lösung mit dem der Zellwandphase entsprechenden pH-Wert von 6,5 oder eine basische Lösung mit pH 8,5 infiltriert.

Die Verwendung von gepufferter Infiltrationslösung mit einem pH-Wert von 6,5 bewirkte keine Veränderung des Sulfitoxidationspotentials in der IWF. Die gemessenen Umsatzraten lagen in einem dem Standardansatz (mit Reinstwasser) vergleichbaren Bereich. Dagegen wurde nach Infiltration mit einer basischen gepufferten Lösung eine Steigerung der Sulfitoxidationsraten festgestellt (Abbildung 12). Der Unterschied zur Kontrolle war in diesem Falle signifikant (U-Test, $p = 0,043$).

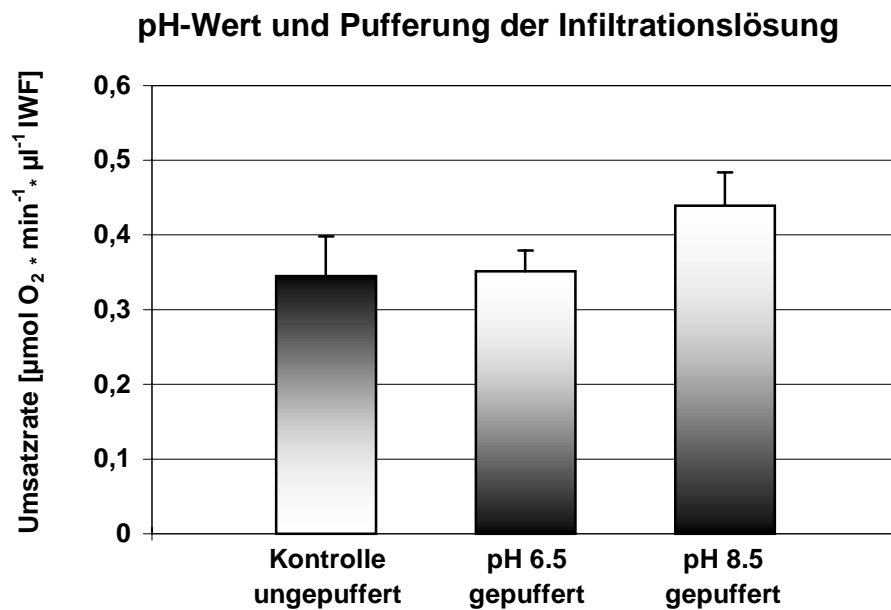


Abbildung 12: Einfluß des pH-Wertes und der Pufferung der Infiltrationslösung auf die Aktivität der apoplastischen Peroxidasen. Dargestellt sind die Umsatzraten sulfitoxidierender Peroxidasen.

Bei der isoelektrischen Fokussierung zeigten die Proben mit saurem pH-Wert ein der Kontrolle (ungepuffert, pH ~ 5,0) weitgehend entsprechendes Bandenmuster mit ähnlichen Peakhöhen-Verhältnissen (Abbildung 13). Das Fehlen des am weitesten im basischen Bereich liegenden Peaks auf den Densitogrammen (Abbildung 14) ist auf den leicht schrägen Lauf der aufgetragenen Proben in diesem Bereich zurückzuführen. Die hierdurch etwas außerhalb der horizontalen Achse liegende Bande wurde vom Densitometer nicht erfaßt.

Die basische, gepufferte Infiltrationslösung bewirkte dagegen einige markante Unterschiede zur Kontrolle. Hier wurden drei deutlich hervortretende Banden im neutralen bis schwach basischen Bereich (→, Abbildung 13 und Abbildung 14) gefunden. Es ist zu vermuten, daß diese Isoformen zur Erhöhung des Sulfitoxidationspotentials in der IWF beigetragen haben.

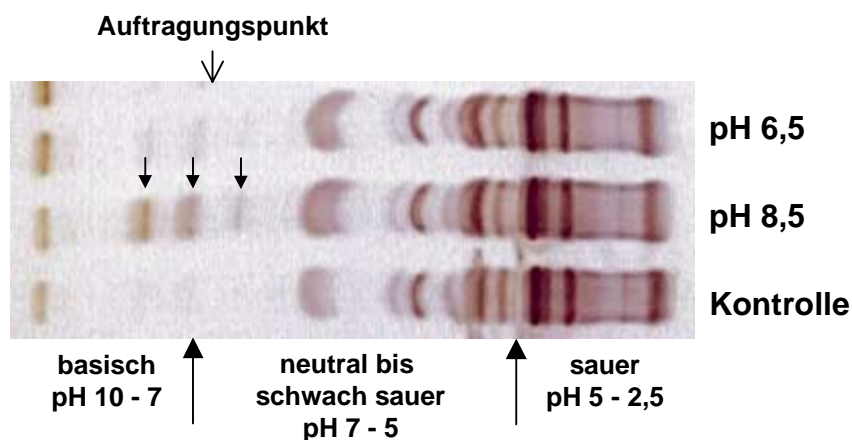


Abbildung 13: Einfluß des pH-Wertes der Infiltrationslösung auf das Bandenmuster der apoplastischen Peroxidaseproteine nach isoelektrischer Fokussierung auf Polyacrylamid-Gel. Färbung mit Guajacol und Benzidin.

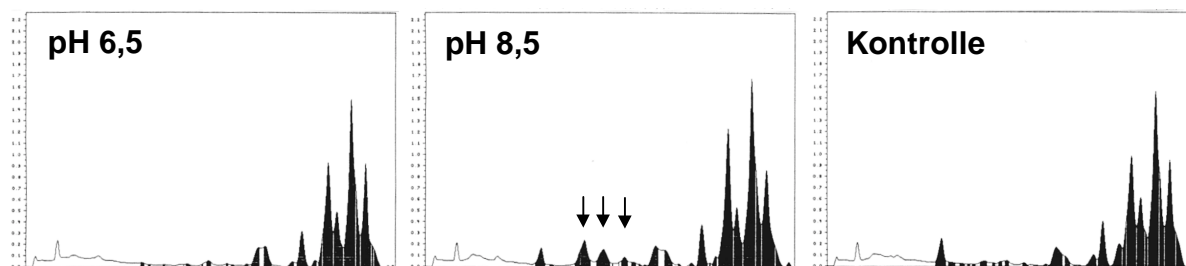


Abbildung 14: Densitogramme der in Abbildung 13 dargestellten Bandenmuster.

Die deutliche Erhöhung der Natrium- und Phosphat-Ionenkonzentration im Apoplasten aufgrund der Pufferung der infiltrierten Lösung mit Na-Phosphat-Puffer (100 mM) hatte diesen Ergebnissen zufolge keinen Einfluß auf die Extraktion der Peroxidasen aus dem Apoplasten.

Dagegen förderte die Anwendung der basischen Infiltrationslösung offenbar die Extraktion neutraler bis schwach basischer Peroxidasen.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Gelelektrophoresen muß auch die Frage nach der Erfäßbarkeit der verschiedenen Peroxidase-Isoformen durch die angewendete Färbemethode diskutiert werden. Bei der Peroxidase-spezifischen Anfärbung der isoelektrisch fokussierten Proteine mit Guajacol, H_2O_2 und Benzidin handelt es sich um eine artefizielle Substratkombination, aus der nach Umsetzung durch Peroxidasen ein wasserunlösliches Polymer aus Benzidin und Guajacol gebildet wird. Nach Untersuchungen von MÄDER et al. [1977] an Tabak setzten alle drei in der Zellwand vorhandenen Gruppen von Isoformen Guajacol und Benzidin um und die K_m -Werte lagen jeweils in ähnlichen Bereichen. Auch NAST [1992] und JANKOWSKY [1993] gehen bei ihren Untersuchungen an apoplastischen Fichten-Peroxidasen von einer Anfärbung sämtlicher Isoformen mit dieser Methode aus. Es kann demzufolge angenommen werden, daß mit der hier durchgeführten Peroxidase-Aktivitätsfärbung alle in der IWF vorhandenen Isoformen erfaßt wurden.

Aussagen über die Spezifität der einzelnen Peroxidase-Isoformen hinsichtlich natürlicher Substrate sind durch diese Färbung nicht möglich. Bei MÄDER et al. [1977] hatte jedoch die Gruppe GI (leicht lösliche Peroxidasen) die höchste Affinität zu verschiedenen getesteten künstlichen Substraten. Sie wurde deshalb mit der Fremdstoffabwehr in Zusammenhang gebracht. Die Untersuchungen von PFANZ et al. [1990] zur Sulfitoxidation löslicher Zellwand-Peroxidasen aus Gerstenblättern bestätigten dies. Die Frage, welche Enzym-Isoformen hohe Sulfitoxidations-Aktivität besitzen und ob diese Isoformen adäquat mit hoher Intensität durch die Färbung mit Guajacol und Benzidin markiert werden, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht geklärt werden. Hier müßten weitere Versuche wie z.B. die Aktivitätsfärbung mit verschiedenen, ausgewählten Substraten, bzw. die Isolierung der aufgetrennten Isoformen mit nachfolgender Einzelanalyse ansetzen. In Anbetracht der geringen aus den Blättern isolierbaren Probenvolumina (vgl. Kap. 4.1.3) war dies aber nicht möglich.

Eine weitere Frage, die im Zusammenhang mit der elektrophoretischen Trennung von Peroxidase-Isoformen und im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der eigenen Ergebnisse mit

denen anderer Autoren diskutiert werden muß, ist die nach der Konstanz der Zahl der detektierbaren Isoformen.

Die Resultate verschiedener Untersuchungen zu dieser Problematik zeigen, daß die Zahl detektierbarer Isoformen stark von der Aufbereitung des Pflanzenmaterials und der Analysenprozedur abhängt. Von fünf anodischen Isoperoxidasen wurde beispielsweise nach Behandlung mit einer Verbindung, die Phenole aus den Proteinen entfernte, nur noch eine Isoform wiedergefunden [SRIVASTAVA und VAN HUUSTEE, 1977]. Von verschiedenen Isoperoxidasen aus Kartoffelpreßsaft konnte nach Chromatographie auf einer Sephadex G-100-Säule bei Zugabe von 2 M CaCl_2 ebenfalls nur noch eine Isoform detektiert werden [DECEDUE und BORCHERT, 1980]. Auch bei Elektrophorese mit verschiedenen Geräten und Gelen änderte sich die Zahl der detektierbaren Banden [PENEL, 1976]. Diese Ergebnisse machen die Einschränkungen der Aussagefähigkeit von elektrophoretischen Untersuchungen der Peroxidase-Isoformen deutlich. Daraus resultiert, daß die in der vorliegenden Studie gefundene Zahl der Peroxidase-Isoformen keinen absoluten, sondern einen relativen Wert unter den gegebenen Bedingungen darstellt.

Dies schränkt jedoch nicht die Möglichkeit ein, unter identischen Bedingungen getrennte und gefärbte Proben zu vergleichen. Auch Vergleiche zwischen verschiedenen Trennläufen, die auf die gleiche Art und Weise durchgeführt wurden, sind möglich, wenn methodisch bedingte Schwankungen der Resultate berücksichtigt werden.

4.2.3.3 Peroxidaseaktivität in der IWF in Abhängigkeit von der Inkubationszeit der Infiltrationslösung in den Blättern

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen über die Auswirkungen erhöhter CaCl_2 -Konzentrationen in der Infiltrationslösung, wurde gleichzeitig überprüft, ob eine Verlängerung der Inkubationszeit der Lösung in den Blättern von 10-15 min auf das Doppelte eine Veränderung der extrahierbaren Peroxidaseaktivität in der IWF zur Folge hatte.

Die Verdoppelung der Inkubationszeit bewirkte keine Erhöhung der POD-Umsatzraten bei der Sulfitoxidation. Im Gegenteil, die Mittelwerte der Sulfitoxidationsraten lagen bei längerer Einwirkungszeit der Infiltrationslösung unter denen, die für die kürzere Zeit ermittelt wurden (Abbildung 15). Die Unterschiede waren allerdings gering, insbesondere, wenn man die teilweise relativ hohen Standardabweichungen der Werte betrachtet.

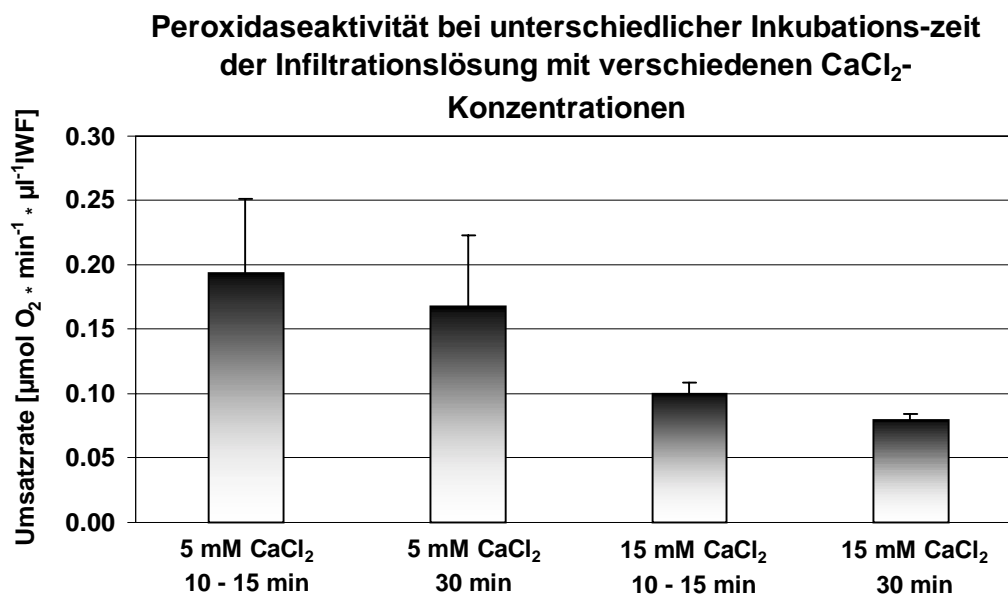


Abbildung 15: Einfluß unterschiedlicher Inkubationszeiten der Infiltrationslösung in den Blättern auf die Aktivität apoplastischer Peroxidasen am Beispiel mit CaCl_2 angereicherter Lösungen.

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß die übliche Einwirkungszeit der infiltrierten Lösung ausreichend war, um einen kompletten Austausch mit der Zellwandphase herbeizuführen und damit alle mit dieser Methode extrahierbaren Peroxidasen tatsächlich mit der IWF zu extrahieren. Hierfür sprechen auch Tracerversuche von PITMAN et al. [1974] bei denen Gerstenblatt-Abschnitte in eine Tracer-Flüssigkeit eingebracht wurden. Die Untersuchungen ergaben eine Zeitspanne von 5-10 min bis der Austausch im Inneren der Gewebestücken stattgefunden hatte. Da in den vorliegenden Versuchen die Verwirbelung der Flüssigkeit im Interzellularraum durch den Infiltrationsvorgang vermutlich den Lösungsprozeß beschleunigte, war hier eine zusätzliche Sicherheit gegeben.

4.2.4 Thermische Stabilität der Peroxidasen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte auch die Temperaturstabilität der Enzymproteine geprüft werden. Die IWF wurde dabei über eine bestimmte Zeitdauer hinweg bei 100°C vorinkubiert, bevor die Sulfitoxidation der Peroxidasen im Standard-Meßansatz bestimmt wurde.

Die Peroxidasen erwiesen sich als relativ temperaturstabile Enzyme. Die Aktivität ging zwar unter Einwirkung der hohen Temperaturen relativ rasch drastisch zurück, nach 5 min betrug die Umsatzrate nur noch etwa 20% des ursprünglichen Wertes, aber selbst nach 20 minütiger Inkubation der IWF bei 100°C besaßen die Peroxidasen noch zwischen 10% und 15% ihrer ursprünglichen Aktivität (Abbildung 16).

Erst nach 55 min war keine Sauerstoffzehrung, die über das Maß der Autoxidation des Sulfits hinausging, in den Küvetten meßbar.

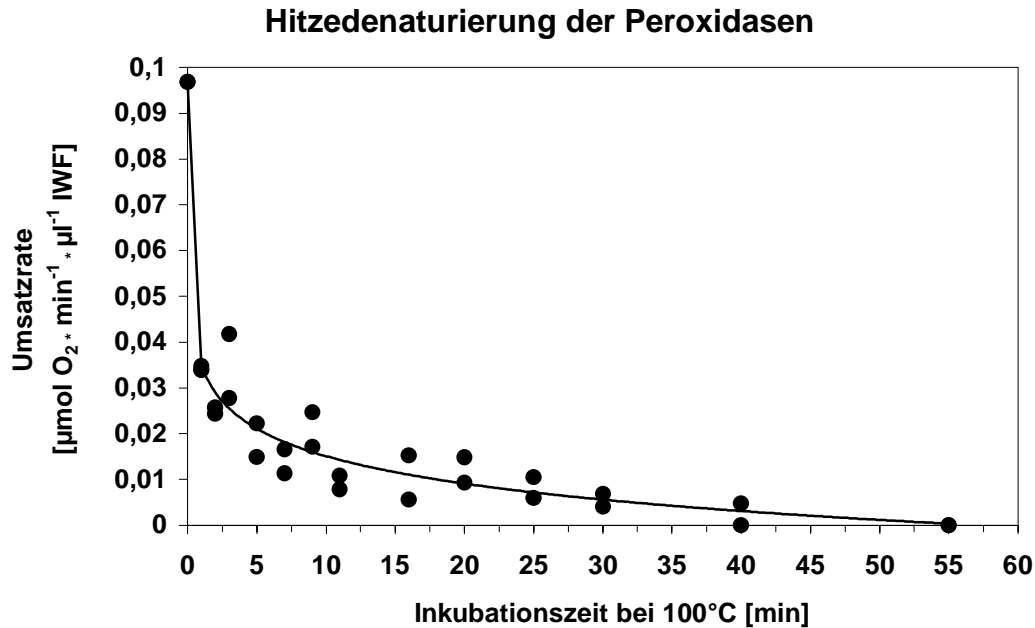


Abbildung 16: Hitzenaturierung sulfitoxidierender Peroxidasen. Abnahme der Umsatzraten nach unterschiedlich langer Einwirkung von 100°C auf die in der IWF gelösten Enzyme.

Die Inaktivierung der Peroxidasen durch die hohen Temperaturen bewies gleichzeitig, daß die gemessenen Umsatzraten nach Zugabe der IWF zum Reaktionsansatz durch eine enzymatische Umsetzung bedingt waren und nicht auf abiotischen Reaktionen der im Ansatz enthaltenen Substanzen beruhten.

Eine ähnlich hohe Temperaturstabilität der Enzyme wurde auch von OPPMANN [1990] und von DUNFORD [1991] für Meerrettich-Peroxidase und von JONES et al. [1998] für Soja-Peroxidasen beschrieben. Die relativ geringe Sensitivität der Peroxidasen gegenüber hohen Temperaturen liegt in der Proteinstruktur dieser Enzyme begründet. Eine wichtige Rolle wird dabei den bereits mehrfach erwähnten Calciumionen im Enzymmolekül zugeschrieben [GASPAR et al., 1982; DUNFORD, 1991], aber auch die glycosidischen Seitenketten des Proteins sollen eine stabilisierende Funktion haben [HU und VAN HUYSTEE, 1989].

4.2.5 Abhängigkeit der enzymatischen Reaktionen vom pH-Wert

Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Peroxidase-Umsatzraten vom pH-Wert des Reaktionsansatzes ergaben ein klar definiertes Optimum der Sulfitoxidation bei pH 7,8 (Abbildung 17). Im Bereich unterhalb des Optimums fielen die Umsatzraten bereits bei pH-Werten um 7,5 deutlich ab. Bei einem pH-Wert von 7,0, also nur 0,8 pH-Einheiten unter dem optimalen pH-Wert, war bereits keine Sulfitoxidation durch die Peroxidasen mehr feststellbar. Der Abfall im basischen Bereich verlief dagegen weniger steil. Hier war erst bei einem pH-Wert von 10,0 keine Sulfitoxidation mehr meßbar.

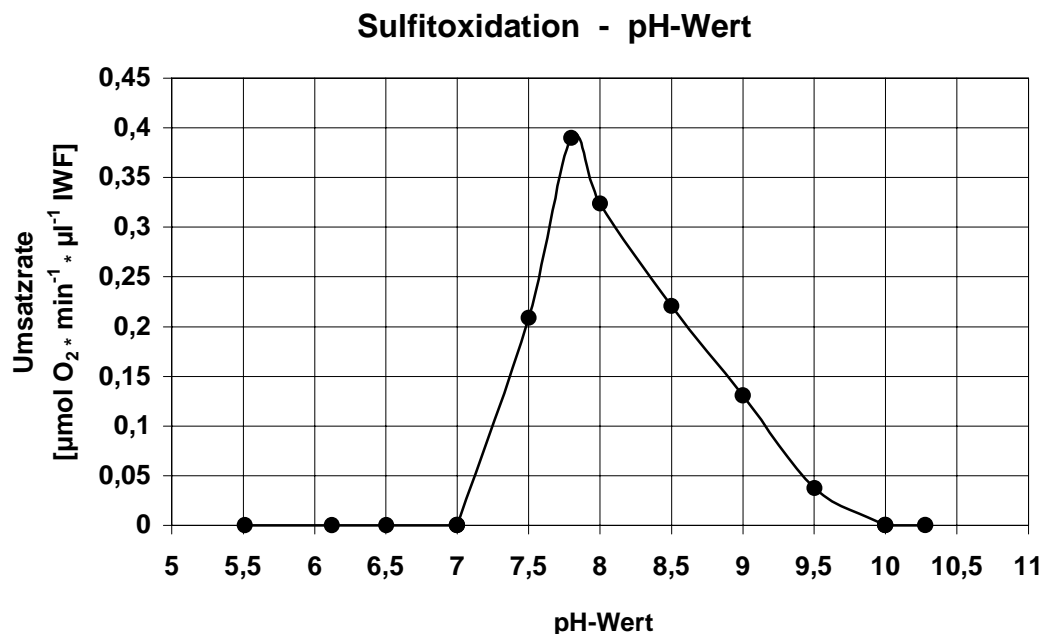


Abbildung 17: pH-Abhängigkeit der Sulfitoxidationsraten apoplastischer Peroxidasen von *Fagus sylvatica*. (Meßwerte gemittelt, Anzahl der gemessenen Parallelen bei kompletter Hemmung der Sulfitoxidation 2-3, bei allen anderen 2-5)

Für die IAA-Oxidation wurde die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Umsetzung im Rahmen einer Diplomarbeit ermittelt [AREND, 1997]. Das pH-Optimum lag hier bei pH 4,0. Der Kurvenverlauf zeigte einen nach beiden Seiten ähnlichen, deutlichen Abfall der Umsatzraten. Bereits bei einem pH-Wert von 3,0 bzw. 5,0 lagen die Raten jeweils um mehr als 50% unter denen im Optimum-Bereich. Vergleichbare Ergebnisse erhielten auch KOKKINAKIS und BROOKS [1979] für den Bereich oberhalb von pH 3,0 mit Peroxidasen aus Pericarp-Gewebe von *Lycopersicon* und PFANZ [1993] für apoplastische Peroxidasen aus *Picea*, *Fagus*, *Armoracia* und *Hordeum*.

Die Ergebnisse der Untersuchungen machen einerseits die große Spannbreite der apoplastischen Peroxidasen hinsichtlich des optimalen pH-Wertes deutlich, aber andererseits auch die klare pH-bedingte Trennung der Sulfit- und IAA-Oxidation.

Die großen Unterschiede in den pH-Optima für Sulfit- und IAA-Oxidation sind offensichtlich in der Art der Bindung dieser beiden Substrate an das Enzym begründet, da die anderen Komponenten der Enzymtests wahrscheinlich keiner so starken pH-bedingten Veränderung unterliegen, daß dies den katalytischen Mechanismus beeinträchtigen würde. H₂O₂ fungiert in beiden Reaktionen als Cosubstrat bzw. „Aktivator“ und die Sulfitoxidation ist nach eigenen Untersuchungen auch unter Beteiligung von Cumarsäure anstelle von Ferulasäure bei pH 7,8 möglich.

Die IAA-Oxidation mit Ferulasäure bei pH 4,0 war nicht möglich. Dies ist jedoch nach Aussagen von GELINAS [1973] durch eine Konkurrenz von IAA und Ferulasäure um die Bindungsstelle an der Peroxidase (in diesem Falle handelte es sich um Meerrettich-Peroxidase) begründet.

Die Aktivität von Enzymen bei unterschiedlichen pH-Werten wird, je nach Enzym, von zwei Faktoren bestimmt: der direkten Mitwirkung ionischer Gruppen am Mechanismus der katalysierten Reaktion und von der Beteiligung geladener Gruppen an der Erhaltung der

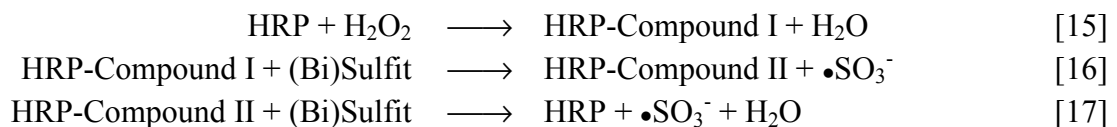
Proteinstruktur [BISSWANGER, 1994]. Da die Optimalbereiche bei beiden Reaktionen relativ schmal waren, läßt sich eine direkte Mitwirkung ionischer Gruppen am Reaktionsmechanismus vermuten. Möglicherweise wurde aber auch die Substratbindung der Enzyme durch Dissoziations- und Assoziationsprozesse auf der Ebene der Quartärstruktur der Proteine durch die pH-Wert-Verschiebung beeinflusst.

Im Falle der IAA läßt das deutlich im sauren Bereich liegende pH-Optimum zudem vermuten, daß das Substrat protoniert vorliegen muß, um optimal mit dem Enzym in Wechselwirkung treten zu können, da der pK-Wert von IAA bei pH 4,7 liegt.

Für die Hemmung im alkalischen pH-Bereich machten GEORGE et al. [1999] eine Veränderung des Calciumgehaltes der Enzyme verantwortlich. Diese Autoren postulierten nach Untersuchungen an Lignin-Peroxidasen aus *Phanerochaete chrysosporium* ein Modell, wonach die Inaktivierung der Peroxidasen bei alkalischem pH-Wert durch einen Verlust des distalen und proximalen Calcium-Ions im Bereich der Häm-Gruppe bewirkt wird.

Nach Untersuchungen von MOTTLEY et al. [1982] an Meerrettich-Peroxidasen ist die Art der Umsetzung von Sulfid durch Peroxidasen bei unterschiedlichen pH-Werten davon abhängig, welche Enzym-Isoformen hauptsächlich an der Reaktion beteiligt sind. Bei pH-Werten von 5-8 im Falle der sauren Isoformen und bei pH-Werten über 7,7 bei basischen Isoformen findet eine Umsetzung statt, bei der das $\bullet\text{SO}_3^-$ -Radikal gebildet wird.

Bei einem pH-Wert von 6,99 (pK_{a2} der schwefeligen Säure) liegen Sulfid- und Bisulfid-Anionen im Verhältnis 1:1 vor. Liegt der pH-Wert höher, so verschiebt sich das Gleichgewicht in der Lösung in Richtung des Sulfid-Anions. Dennoch kommen bei pH-Werten über 7,0 beide Spezies vor. MOTTLEY et al. [1982] postulierten demnach Reaktionen, die beide Verbindungen berücksichtigen:



Das Radikal wurde in diesem Falle über Elektronenspinresonanz nachgewiesen.

Die weiteren, letztendlich zum Sulfat führenden, Reaktionen wurden bereits in Kap. 1.4 beschrieben.

Den gefundenen pH-Abhängigkeiten zufolge erscheint es fraglich, ob beide Reaktionen zum gleichen Zeitpunkt in der Zellwandphase ablaufen können, bzw. ob eine Sulfidoxidation unter den üblichen, leicht sauren Bedingungen im Apoplasten überhaupt möglich ist. Bei der Diskussion dieser Ergebnisse darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, daß es sich hierbei um *in vitro* Untersuchungen handelte, bei denen die Enzymaktivität zwar mit natürlichen Substraten, aber dennoch in einem künstlichen System bestimmt wurde. Diese Messungen sind in der Lage, Anhaltspunkte für die in den Blättern ablaufenden Prozesse zu liefern, können jedoch nicht die Prozesse in der Zellwandphase simulieren. Deren Mikroporosität ermöglicht die Bildung kleinster Reaktionsräume, in denen die Milieubedingungen im wesentlichen durch die Präsentation geladener Gruppen und die punktuelle Konzentration freier Ionen und Substratmoleküle determiniert sind.

Anhaltspunkte für eine tatsächlich *in situ* ablaufende Sulfidoxidation lieferten Versuche von PFANZ et al. [1990] an Gerstenblättern, bei denen eine sulfithaltige Lösung über die Stomata der Blätter infiltriert wurde. Die nachfolgend in mehreren zeitlichen Intervallen aus den

aliquotierten Proben extrahierte Interzelluläre Waschflüssigkeit enthielt Sulfat in linear mit der Zeit ansteigenden Konzentrationen.

4.2.6 Einfluß von Ascorbat auf die Umsatzraten der Peroxidasen

Im Hinblick auf die Immissionsstreß-Versuche war es von Interesse, die Wechselwirkungen zwischen den apoplastischen Peroxidasen und dem Radikalfänger und potentiellen Substrat Ascorbat zu untersuchen. Deshalb wurde Ascorbat in verschiedenen Konzentrationen dem Meßansatz zugesetzt und die Sulfitoxidations-Aktivität der Enzyme zu überprüft

Ascorbat bewirkte bereits in niedrigen Konzentrationen eine Hemmung der Sulfitoxidation (Abbildung 18). Bei einem Zusatz von 0,01 bis 0,02 μM Ascorbat lagen die Umsatzraten bereits etwa um 50% niedriger als die Kontrollwerte. Die Schwankungsbreite der Umsatzraten war allerdings hoch und eine Steigerung der Ascorbatkonzentration verminderte die Umsatzraten nicht weiter. Die Hemmung war zu einem gewissen Grade reversibel. Nach wenigen Minuten (4-11 min) wurden wieder höhere Sauerstoffzehrungsraten im gleichen Reaktionsansatz gemessen.

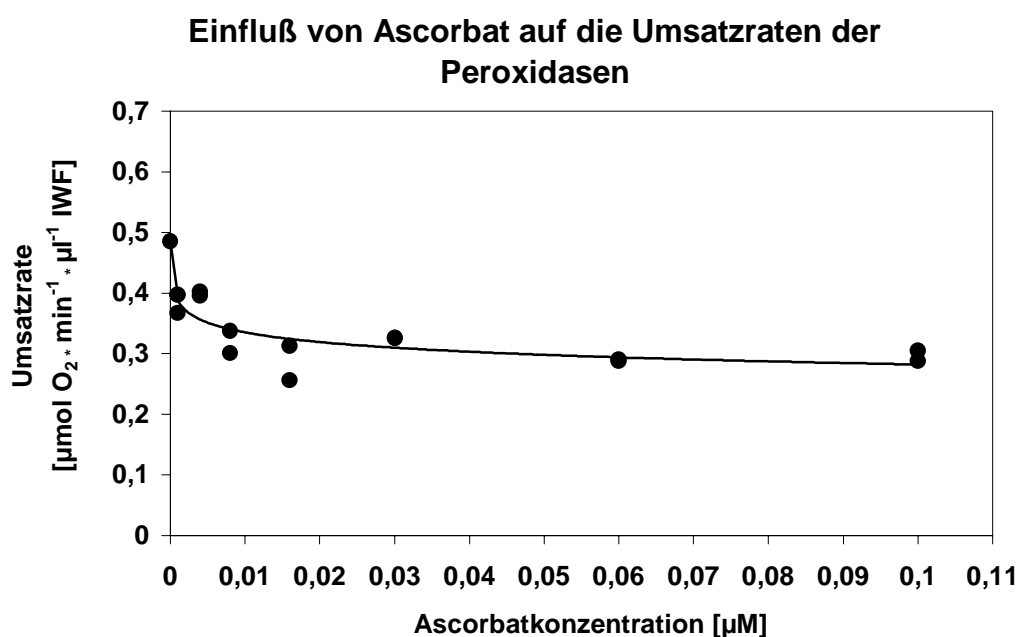
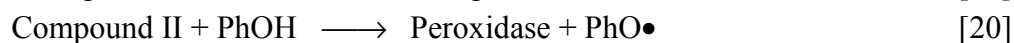


Abbildung 18: Hemmung der Sulfitoxidation bei Zusatz von Ascorbat zum Reaktionsansatz.

Diese Ergebnisse bestätigen die Wirkung des Ascorbats als Radikalfänger. Die Folge der Zugabe von Ascorbat zum Reaktionsansatz war demnach die Verminderung der Konzentration freier Radikale in der Lösung und damit eine verringerte Sauerstoffzehrung durch Radikalkettenreaktionen. Bei Umwandlung des Ascorbats in Dehydroascorbat wird dieser Effekt geringer, so daß nach einiger Zeit in der Küvette wieder eine stärkere Sauerstoffzehrung durch die Oxidation von Sulfit zu Sulfat stattfindet.

CASTILLO et al. [1984b] stellten bei Untersuchungen an *Sedum album* und *Pelargonium zonale* fest, daß Ascorbat bei der Guajacol-Oxidation durch Peroxidasen mit intermediären Produkten reagierte und somit eine hemmende Wirkung auf den Reaktionsablauf hatte. Auch

Untersuchungen von TAKAHAMA und ONIKI [1992 und 1997] zeigten eine Inhibierung der Oxidation phenolischer Verbindungen in Peroxidase/ H_2O_2 -Systemen durch niedrige Ascorbinsäurekonzentrationen, für die folgender Reaktionsmechanismus postuliert wurde:



(nach TAKAHAMA und ONIKI, 1997; PhOH = phenolische Verbindung, $\text{PhO}\bullet$ = Phenoxyl-Radikal, AA = Ascorbinsäure, MDA = Monodehydro-Ascorbinsäure, DHA = Dehydro-Ascorbinsäure)

Die Oxidation von Ascorbat wird somit durch die Intermediärverbindungen, die bei der Reaktion der Peroxidasen mit phenolischen Substraten wie z.B. Ferulasäure, Cumarsäure oder Kaffeesäure entstehen, vermittelt. Diese stehen demnach nicht mehr als Reaktionspartner bei der Sulfitoxidation zur Verfügung.

Dieser Reaktionsmechanismus kann die gefundenen Effekte des Ascorbats auf die Sulfitoxidation erklären.

In vivo wird Ascorbat aufgrund seiner Eigenschaften als Radikalfänger eine regulatorische Rolle bei Peroxidasereaktionen, insbesondere bei Reaktionen, die der Festigung der Zellwand dienen, wie z.B. der Bildung von Dehydroferulat-Brücken zwischen Zellwandpolysacchariden (vgl. Kap. 1.4), zugeschrieben. Die Regulation der apoplastischen H_2O_2 -Konzentration und die Abwehr von Radikalen unter Streßbedingungen sind weitere wichtige Funktionen des Ascorbats [TAKAHAMA und ONIKI, 1992; SANCHEZ et al. 1997].

Unter oxidativem Streß wurde von CASTILLO und GREPPIN [1986] bei *Sedum* eine erhöhte Abgabe von Ascorbat und Peroxidasen in den Apoplasten festgestellt und deren protektive Funktion unterstrichen. CHAMEIDES [1989] postulierte nach Modellberechnungen zum Chemismus der Reaktionen von Ozon im Blatinneren sogar eine Schlüsselrolle von apoplastischem Ascorbat beim Schutz vor oxidativen Schädigungen.

Die Sulfitoxidation im Apoplasten müßte diesen Ergebnissen zufolge durch eine erhöhte Ascorbatkonzentration unter Streßbedingungen gehemmt werden. Sofern jedoch auch eine erhöhte Sekretion von Peroxidasen in die Zellwand stattfindet, wird dieser Effekt gemindert. Zudem muß berücksichtigt werden, daß Ascorbat unter oxidativem Streß einer verstärkten Umwandlung in Dehydroascorbat unterliegt [CASTILLO et al., 1987; LUWE et al. 1993] und damit diesen Reaktionen entzogen wird.

4.2.7 Zusammenfassung

Im Rahmen der methodischen Untersuchungen zur IWF-Gewinnung und zur Messung der Peroxidaseaktivität wurde festgestellt, daß eine starke Erhöhung der Ionenkonzentration in der Infiltrationslösung die Extraktion bzw. die Aktivität der Peroxidasen negativ beeinflusste. Dagegen hatte eine geringfügige Erhöhung der Calciumkonzentration von 1 mM auf 5 mM einen positiven Effekt.

Eine Pufferung der Infiltrationslösung im sauren pH-Bereich hatte keine Auswirkungen auf die Zahl der isolierten Peroxidase-Isoformen und deren Aktivität. Die Verwendung einer basischen, gepufferten Lösung erhöhte dagegen die Zahl der neutralen und schwach basischen Isoformen in der IWF sowie die Sulfitoxidations-Aktivität pro IWF-Volumeneinheit.

Eine 5 bis 10 minütige Inkubationszeit der Infiltrationslösung in den Blättern ist als ausreichend anzusehen.

Maximale Sulfit- und IAA-Oxidationsraten der Peroxidasen der drei Laubbaumarten konnten im Vergleich zu den bisher untersuchten Enzymen aus *Picea* und *Hordeum* erst bei deutlich höheren Substratkonzentrationen erreicht werden. Bei den drei Laubbaumarten waren die benötigten Substratkonzentrationen dagegen weitgehend ähnlich.

Mit Hilfe der optimierten Meßverfahren wurde ein Vergleich zwischen Aktivitätsmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Vegetationsperiode bei einer Baumart und ein Vergleich zwischen den Enzymaktivitäten verschiedener Baumarten möglich.

Die untersuchten Peroxidasen wiesen eine hohe Temperaturstabilität auf. Hierfür wird die Tertiärstruktur der Peroxidasemoleküle und die stabilisierende Wirkung der darin eingebundenen Ca-Ionen verantwortlich gemacht.

Die Sulfitoxidation wurde durch eine Zugabe von Ascorbat zum Meßansatz gehemmt. Diese Hemmung konnte auf die Wirkung des Ascorbats als Radikalfänger zurückgeführt werden.

Die pH-Optima der Sulfit- und der IAA-Oxidationsreaktionen unterschieden sich deutlich (pH 7,8 und pH 4,0), was vermutlich durch Unterschiede in der Art der Bindung des jeweiligen Substrates begründet ist.

4.3 Immissionsstreß-Versuche

Die Jungpflanzen der drei Baumarten *Fagus sylvatica*, *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* wurden in Open-Top-Kammern (OTC) einer Langzeitbegasung mit Schwefeldioxid- und Ozonkonzentrationen ausgesetzt, die mit $80\mu\text{g}/\text{m}^3$ SO_2 und $120\mu\text{g}/\text{m}^3$ O_3 über den in den oberen Lagen des Erzgebirges gemessenen Jahresmittelwerten lagen, aber noch deutlich unter den dort auftretenden Maxima (vgl. Tabelle 2 Kap. 1.1).

In den folgenden Kapiteln sollen die Streßreaktionen unter dieser chronischen Belastung mit Luftschadstoffen dargestellt werden.

4.3.1 Schadsymptome der Blätter

Alle drei Baumarten bildeten unter Immissionsbelastung makroskopisch erkennbare Schadsymptome auf den Blättern aus, die sich mit zunehmendem Blattalter verstärkten. Die Abbildungen 19, 20 und 21 zeigen das Fortschreiten des Pigmentabbaus in den Blättern im Verlauf der ersten Probenahmeperiode, wie es mit Hilfe der Farbtafel semiquantitativ festgehalten wurde (vgl. Kap. 3.1.1.3).

Die frühesten und stärksten Schädigungssymptome zeigten sich bei *Sorbus aucuparia*. Bei dieser Baumart hatten bereits Ende Juli über 60% der SO_2 -belasteten Pflanzen mehrheitlich als seneszent bzw. geschädigt eingestufte Blätter. Bei den mit SO_2 und Ozon begasten Pflanzen lag dieser Anteil sogar bei über 70% (Abbildung 19). Bei den beiden anderen Baumarten wurden zu diesem Zeitpunkt dagegen deutlich geringere Schädigungen festgestellt. Hier waren bei keiner Pflanze mehr als die Hälfte aller Blätter verfärbt (Abbildung 20 und Abbildung 21).

Anfang September wurde bei den Ebereschen der SO_2 -Variante eine Zunahme der Pflanzen mit überwiegend verfärbten Blättern um etwa 30% festgestellt. Unter Belastung mit der Schadstoffkombination wurde, nicht zuletzt aufgrund der ohnehin bereits hohen Anzahl geschädigter Blätter, nur noch eine geringfügige weitere Verschlechterung des Zustandes der Pflanzen beobachtet. Bei den Birken wurden Anfang September unter SO_2 -Belastung noch keine vergilbten Blätter festgestellt. Dagegen waren die mit der Schadstoffkombination behandelten Pflanzen deutlich stärker beeinträchtigt. Hier hatten mehr als 50% aller Pflanzen überwiegend seneszente bzw. geschädigte Blätter und bei über 30% aller Pflanzen wurden zumindest einige verfärbte Blätter beobachtet. Bei den Buchen lag der Anteil der Pflanzen, bei denen mehr als die Hälfte der Blätter als seneszent bzw. geschädigt eingestuft wurden, unter SO_2 -Belastung bei rund 40%. Hier hatte die Begasung mit SO_2 und Ozon etwas geringere Auswirkungen auf die Laubfärbung (Anfang September weniger als 10% der Pflanzen mit mehrheitlich vergilbten Blättern und 60% mit einigen vergilbten Blättern).

Bis Anfang Oktober hatte die Laubverfärbung die schadstoffbelasteten Ebereschen komplett erfaßt. Auch der Laubfall hatte bereits verstärkt eingesetzt, so daß keine Probenahme mehr durchgeführt werden konnte. Auf eine ausführliche Bonitierung der Pflanzen wurde daher verzichtet. Bis zu diesem Zeitpunkt hatte sich auch der Zustand der Belaubung der schadstoffbelasteten Buchen deutlich verschlechtert, aber die Laubverfärbung zeigte sich jetzt auch bei einem beträchtlichen Anteil der Kontrollpflanzen. Dagegen wurde bei *Betula* lediglich unter Begasung mit SO_2 eine deutliche Zunahme des Anteils geschädigter bzw. seneszenten Blätter festgestellt.

Hinsichtlich der makroskopisch erkennbaren Schadsymptome der Blätter erwies sich die Baumart *Betula pendula* damit als weniger sensitiv gegenüber der Schadstoffbelastung als die

beiden andern Baumarten. Es sei jedoch an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß bei den Birken bereits in der Mitte der Vegetationsperiode ein Teil der offensichtlich geschädigten Blätter abgeworfen wurde und ein Neuaustrieb an den Zweigspitzen einsetzte, während dies bei den beiden anderen Baumarten nicht der Fall war. Die erkennbar jüngeren Blätter wurden in die Bonitierung nicht mit einbezogen. Dennoch war aufgrund der frühzeitigen Blattabszission der Anteil geschädigter oder seneszenten Blätter tatsächlich etwas höher, als die Ergebnisse der Bonitierung erkennen lassen.

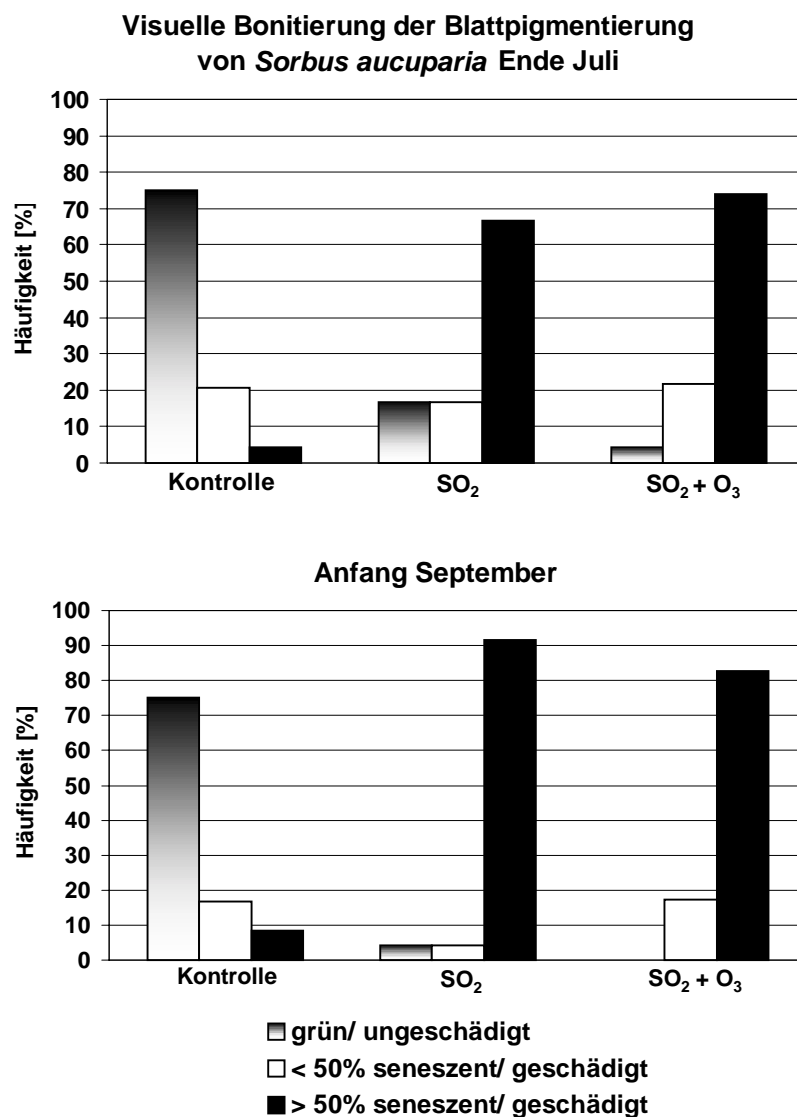


Abbildung 19: Veränderungen des Schädigungsgrades der Blätter von *Sorbus aucuparia* im zeitlichen Verlauf der Vegetationsperiode 1996. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Pflanzen, bei denen keine, weniger als 50% oder mehr als 50% der Blätter mit Hilfe der Farbtafel als seneszent oder geschädigt eingestuft wurden (vgl. Kap. 3.1.1.3).

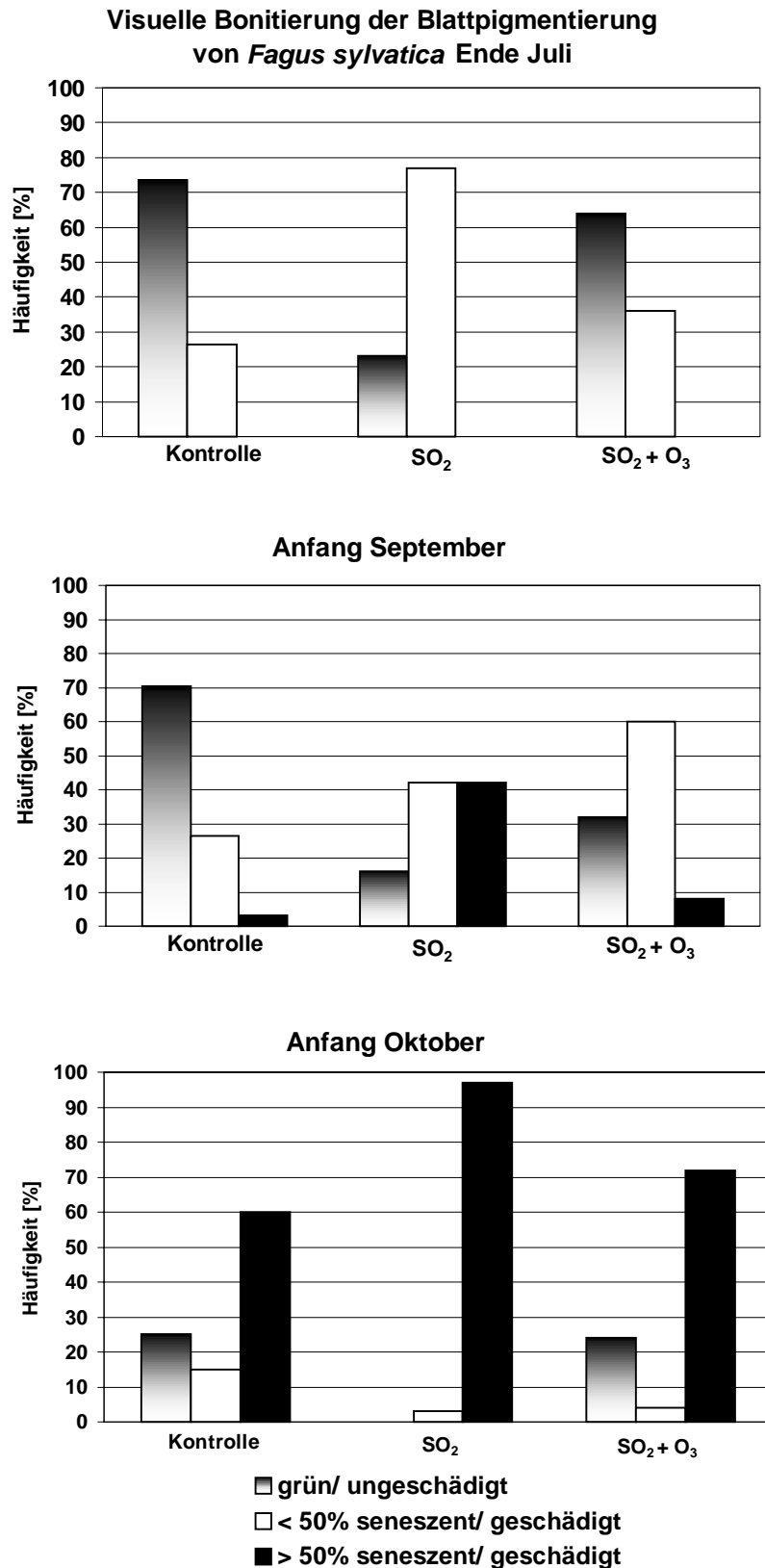


Abbildung 20: Veränderungen des Schädigungsgrades der Blätter von *Fagus sylvatica* im zeitlichen Verlauf der Vegetationsperiode 1996. Prozentualer Anteil der Pflanzen, bei denen keine, weniger als 50% oder mehr als 50% der Blätter mit Hilfe der Farbtabelle als seneszent oder geschädigt eingestuft wurden (vgl. Kap.3.1.1.3).

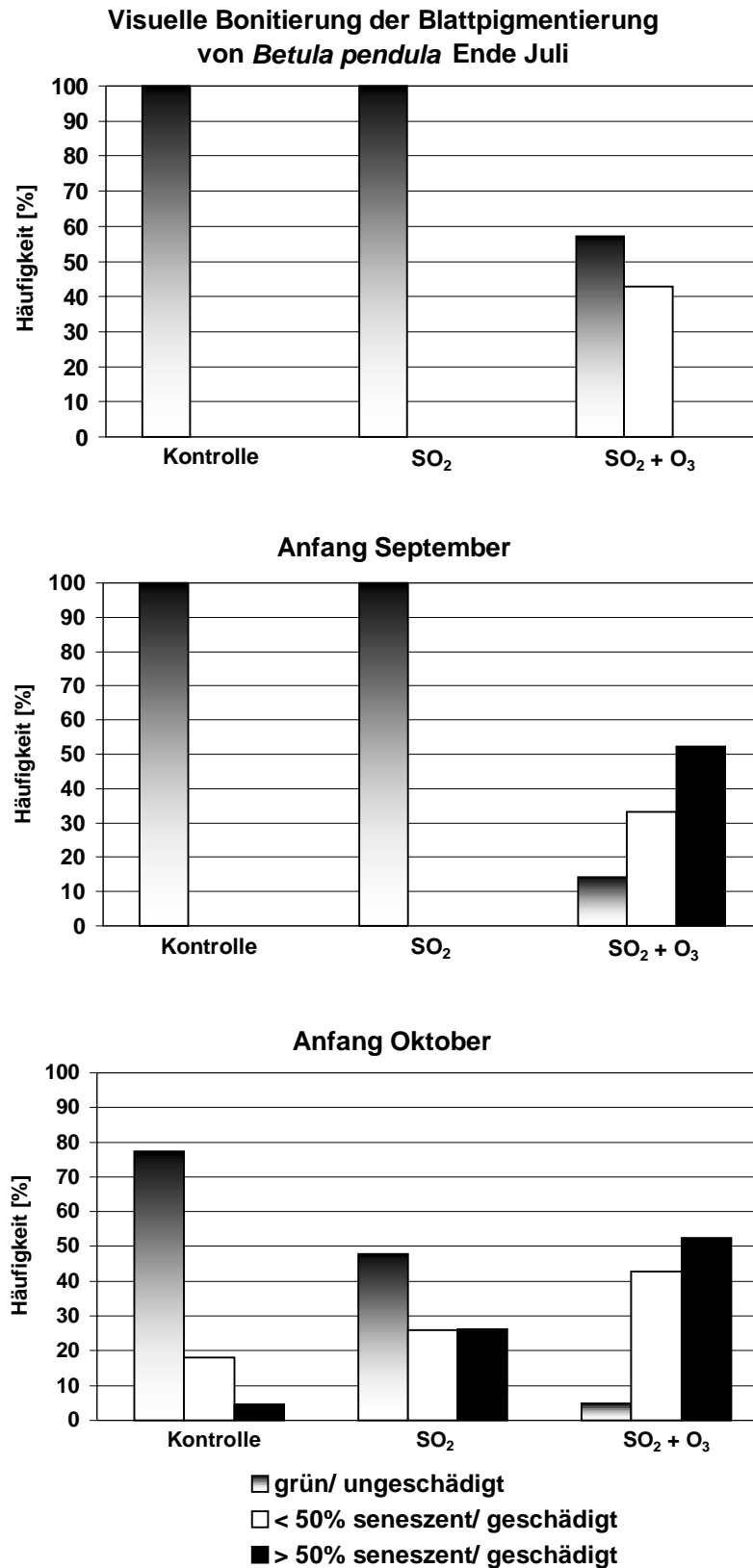


Abbildung 21: Veränderungen des Schädigungsgrades der Blätter von *Betula pendula* im zeitlichen Verlauf der Vegetationsperiode 1996. Prozentualer Anteil der Pflanzen, bei denen keine, weniger als 50% oder mehr als 50% der Blätter mit Hilfe der Farbtabelle als seneszent oder geschädigt eingestuft wurden (vgl. Kap. 3.1.1.3).

Bei der Herausbildung von Schadsymptomen unter Belastung mit Luftschadstoffen wurde auch die Entstehung von Chloroseflecken und Nekrosen beobachtet. Diese wurden bei der Bonitierung der Pflanzen gesondert erfaßt.

Die Bildung von Chlorosen zwischen den Blattadern war insbesondere bei den mit SO₂ und Ozon behandelten Pflanzen aller drei Baumarten deutlich erkennbar. In den chlorotischen Bereichen kam es in der zweiten Hälfte der Vegetationsperioden häufig auch zu fleckigen, orangegelben bis bräunlichen Verfärbungen. Bei den Birken wurde unter dem Einfluß der SO₂-Ozon-Kombination zudem die rasche Herausbildung scharf abgegrenzter, kupferfarbiger Blattnekrosen beobachtet. Diese betrafen, wie mikroskopische Untersuchungen ergaben, vor allem die obere Epidermis und das Palisadenparenchym. Im fortgeschrittenen Stadium wurde aber auch das Schwammparenchym zerstört (Abbildung 22 und Abbildung 24).

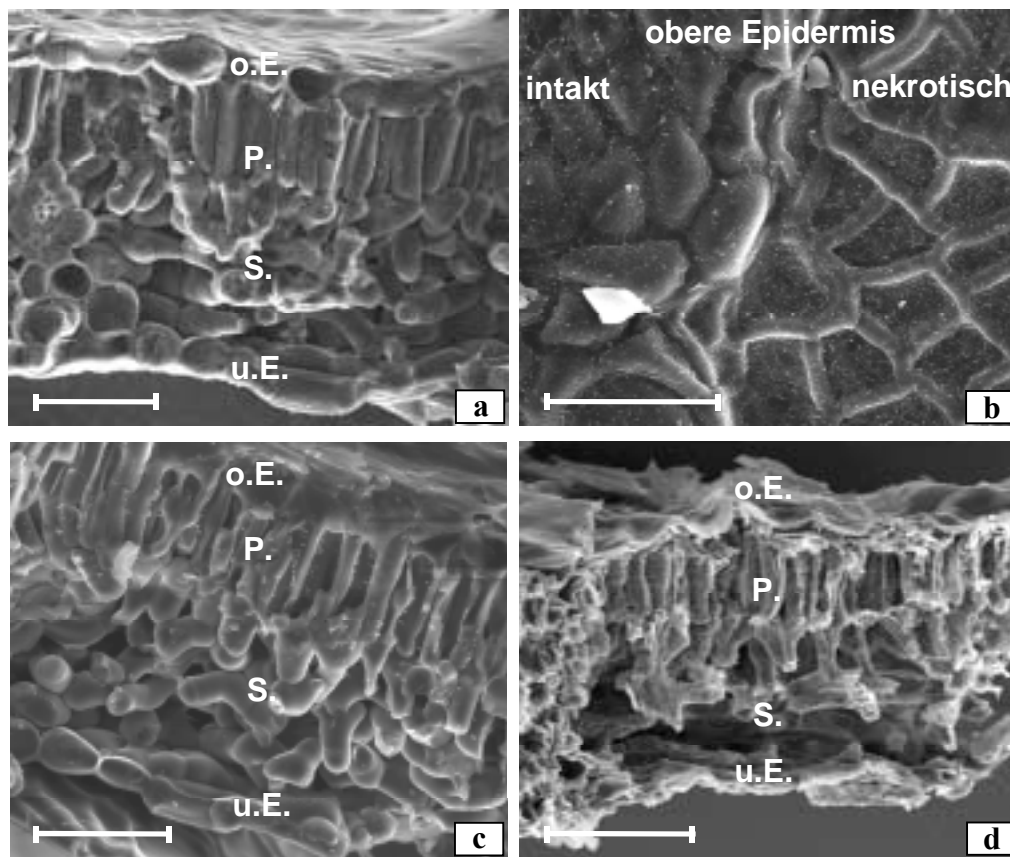


Abbildung 22: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen einiger Blätter von *Betula pendula*.

- a: Querbruch durch ein ungeschädigtes Blatt der Kontroll-Variante
- b: Aufsicht auf die obere Epidermis eines durch SO₂ und Ozon geschädigten Blattes mit Nekrosen
- c: Querbruch durch ein geschädigtes Blatt der SO₂-Ozon-Variante mit kollabierten Zellen im Palisadenparenchym
- d: Querbruch durch eine vollkommen zerstörte Region eines mit SO₂ und Ozon belasteten Blattes

Die Länge des Balkens entspricht jeweils 50 µm.

Abkürzungen: o.E. = obere Epidermis; S. = Schwammparenchym; P. = Palisadenparenchym;
u.E. = untere Epidermis

Teilweise wurden auch ebenso scharf abgegrenzte, eingesunkene Bereiche auf der Blattoberseite beobachtet, die offenbar durch das Kollabieren darunterliegender Zellen bedingt waren, aber nicht als Nekrosen in Erscheinung traten. Möglicherweise handelte es sich hier um ein Vorstadium der Nekrotisierung. Bei den Birken hatte die Begasung mit der Schadstoffkombination über mehrere Vegetationsperioden offensichtlich eine kumulative Wirkung, da in der Vegetationsperiode 1997 sowohl eine zeitigere Ausbildung der Schadsymptome auf den Blättern, als auch eine früher und intensiver einsetzende Abszission von Blättern in der Nähe der Zweigbasis beobachtet wurden. Da *Betula pendula* zu den Baumarten gehört, die während der Vegetationsperiode über lange Zeit hinweg neue Blätter bilden können („Populus-Typ“, HOFFMANN, 1972), erscheint eine solche sequentielle Seneszenz von Blättern, die den Schadstoffen bereits über längeren Zeitraum hinweg ausgesetzt waren, als eine sinnvolle Streßbewältigungsstrategie. Ein ähnliches Verhalten dieser Baumart wurde auch von MATYSSEK et al. [1995] sowie MAURER und MATYSSEK [1997] bei Begasung mit Ozon festgestellt. Bei diesen Untersuchungen zeigten Pflanzen mit gutem Ernährungszustand eine hohe Blatterneuerungs-Rate, während die Blätter bei schlechter ernährten Pflanzen länger an den Zweigen verblieben. Es kann demnach davon ausgegangen werden, daß der Ernährungszustand der Birken im vorliegenden Falle ausreichend war, um eine hohe Blatterneuerungs-Rate zuzulassen.

Die ausschließlich mit SO₂ begasten Birken hatten fast über die gesamte Vegetationsperiode hinweg lediglich eine insgesamt etwas hellere Blattfarbe und in einigen Fällen die Ausbildung von Chloroseflecken beobachtet (Abbildung 23).

Bei *Sorbus aucuparia* wurde unter Belastung mit SO₂ eine gleichmäßige hell gelbgrüne Färbung der Blätter nahezu aller Pflanzen beobachtet. Die Ausbildung von Chlorosen war hier selten. Insbesondere im Spätsommer der ersten Probenahmeperiode kam es zu einer frühzeitigen intensiven Rotfärbung der Blätter, während die Kontrollpflanzen noch weitgehend grüne Blätter hatten (Abbildung 25). Eine verstärkte Akkumulation von Anthocyanen als Begleiterscheinung von Streßreaktionen, die eine frühzeitige Seneszenz bewirkten, ist hier denkbar. Die Kontrollpflanzen prägten unter denselben klimatischen Bedingungen und Lichtverhältnissen im Verlauf der herbstlichen Blattalterung eine deutlich spätere und überwiegend gelbe Laubfärbung aus. MOHR und SCHOPFER [1985] beschreiben Anthocyanbildung als Nebenprodukt eines mit hoher Intensität ablaufenden klimakterischen Stoffwechsels.

Bei den mit SO₂ und Ozon begasten Ebereschen entwickelten sich dagegen vielfach die oben beschriebenen fleckigen, orangegelben bis bräunlichen Verfärbungen zwischen den Blattadern (Abbildung 25 unten).

Im Frühjahr des zweiten Probenahme-Jahres wurde sowohl bei den mit Schadgasen belasteten Birken als auch bei den Ebereschen ein etwa um eine Woche verzögerter Austrieb der Knospen im Vergleich zu den Kontrollen beobachtet.

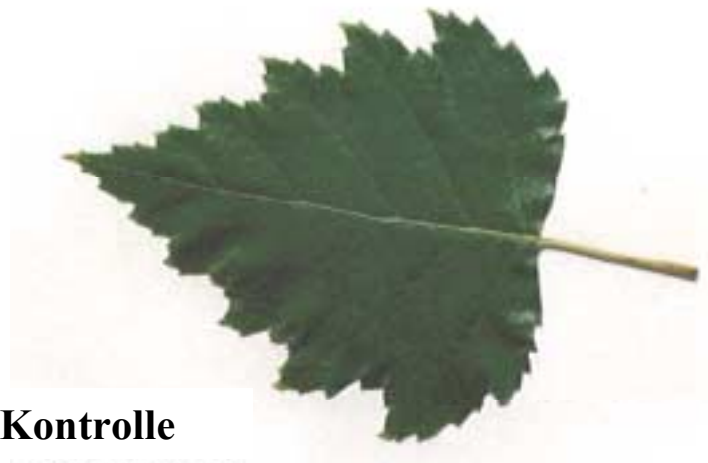
**Kontrolle****SO₂****SO₂**

Abbildung 23: Schädigungssymptome der mit SO₂ belasteten Birkenblätter nach 15 wöchiger Begasung im ersten Probenahme-Jahr. Alle abgebildeten Blätter waren rund 15 bis 16 Wochen alt. Es wurden diejenigen mit den deutlichsten Schadsymptomen ausgewählt. Die Mehrzahl der Blätter zeigte geringere Schädigungsanzeichen.

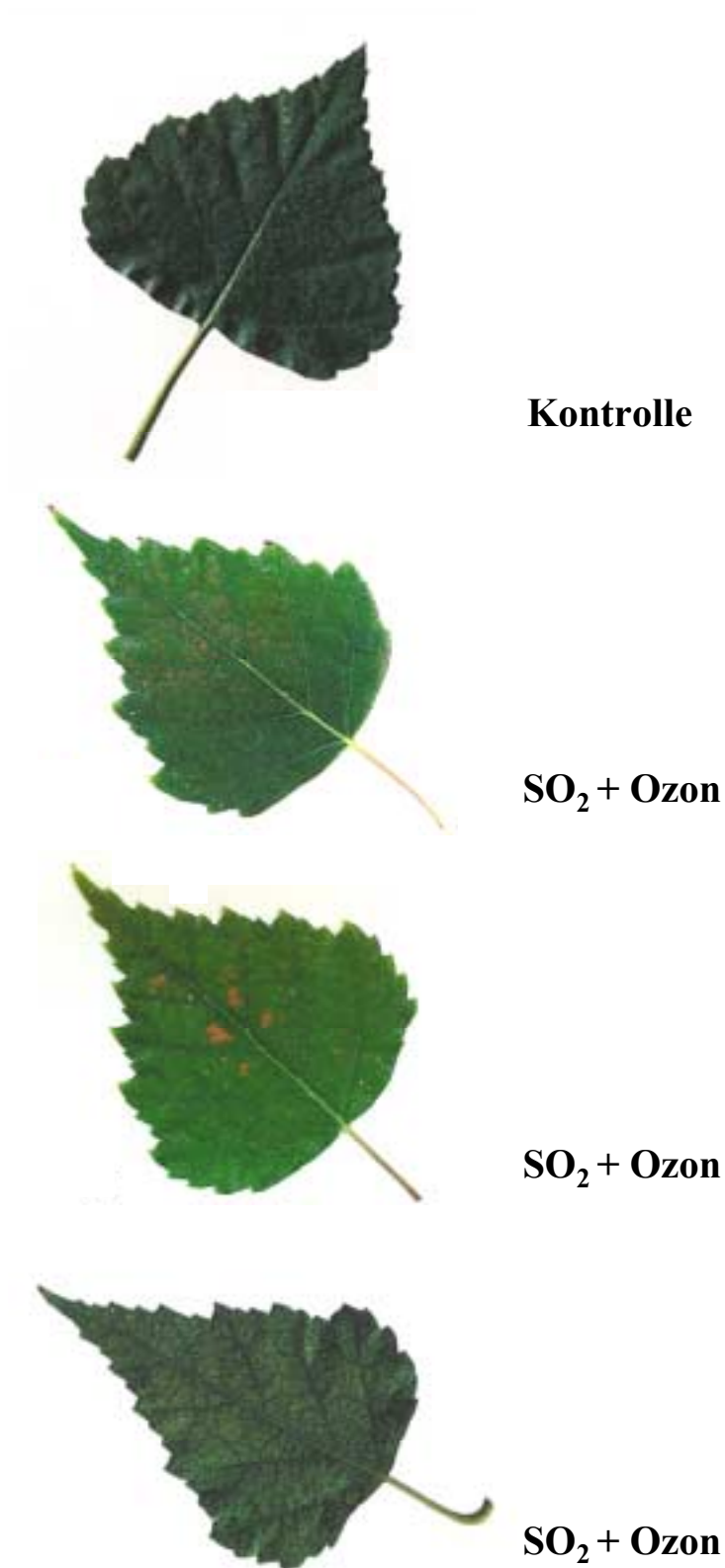


Abbildung 24: Spektrum der verschiedenen Schadsymptome der Birkenblätter nach 15 wöchiger Belastung mit SO_2 und Ozon. Die rotbraunen, scharf abgegrenzten Nekrosen (Mitte) und die punktförmigen eingesunkenen Blattbereiche (unten) sind deutlich erkennbar. Alle Blätter waren zum Zeitpunkt der Probenahme etwa 15 bis 16 Wochen alt.

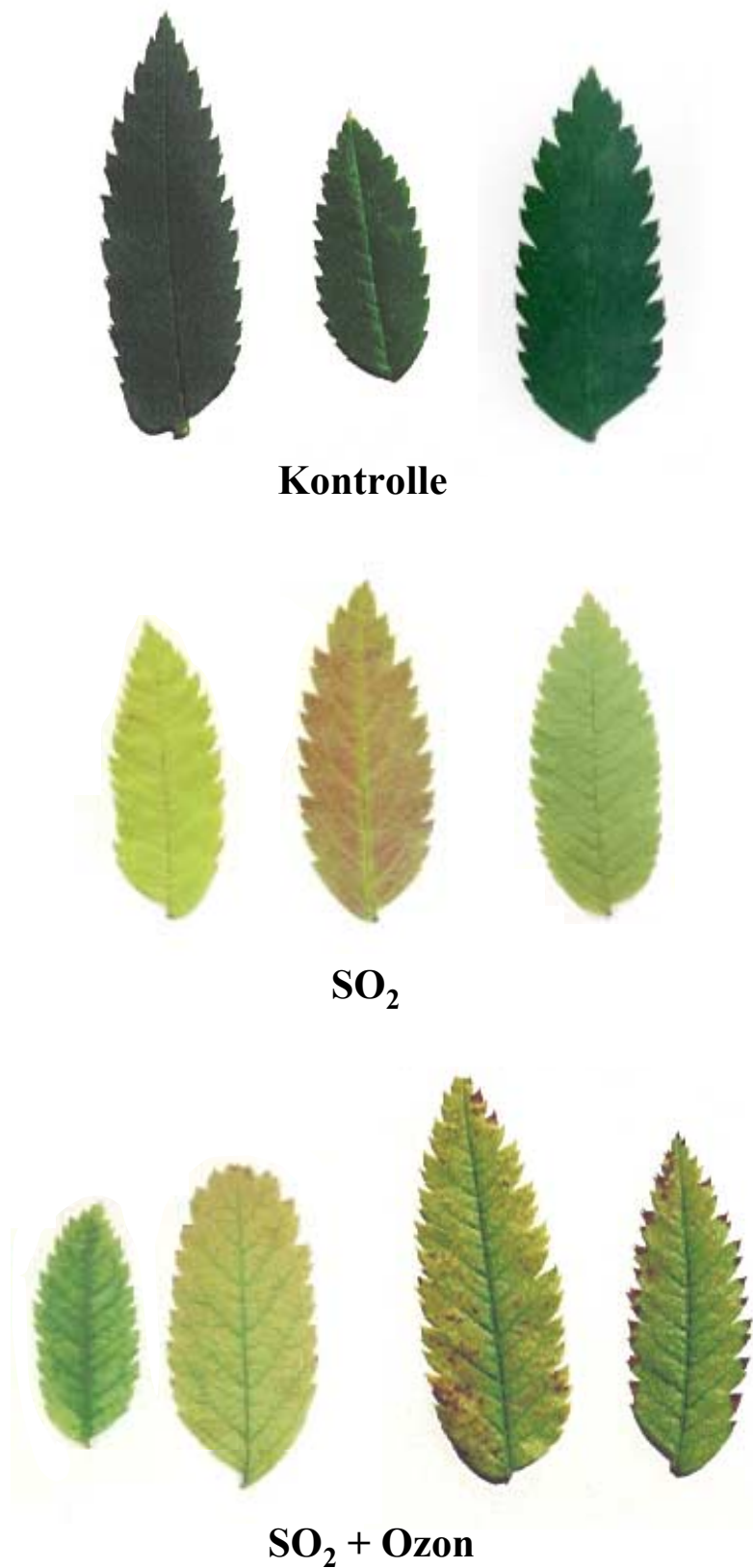


Abbildung 25: Spektrum der Schädigungssymptome bei Ebereschenblättern nach 15 wöchiger Belastung mit Schwefeldioxid und mit einer Kombination aus Schwefeldioxid und Ozon. Alle Blätter waren zum Zeitpunkt der Probenahme etwa 15 bis 16 Wochen alt.

Die Blätter der begasten Buchen-Pflanzen wiesen bei beiden Varianten leichte bis mittelstarke Vergilbungserscheinungen auf, die sich als gelbgrüne Streifen zwischen den Blattadern, oder als gleichmäßiger Pigmentverlust des gesamten Blattes zeigten. An vielen Pflanzen wurden zudem scharf abgegrenzte, braune Nekrosen beobachtet (Abbildung 26). Beide Schadsymptome verstärkten sich im Verlauf der Vegetationsperiode.

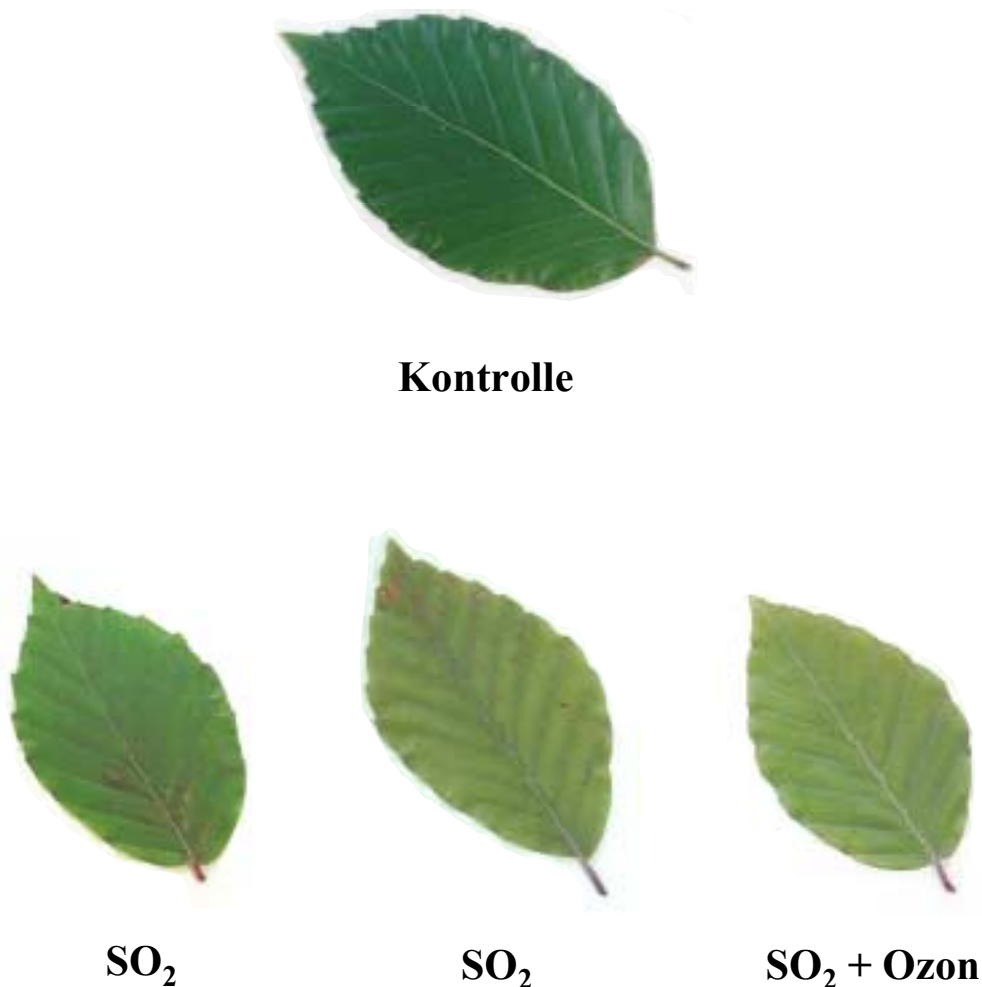


Abbildung 26: Schädigungssymptome von Buchenblättern nach 15 wöchiger Belastung der Pflanzen mit Luftschadstoffen im ersten Probenahme-Jahr. Alle abgebildeten Blätter waren zum Zeitpunkt der Probenahme etwa 14 Wochen alt.

Das bei den drei Baumarten beobachtete Spektrum äußerlicher Schädigungsmerkmale der Blätter entsprach weitgehend den in der Literatur als charakteristisch für die Einwirkung von Luftschadstoffen beschriebenen Symptomen [HEATH, 1980; GUDERIAN et al., 1985; ELSTNER und HIPPEL, 1995; BERGMANN et al., 1999; BUNGNER et al., 1999].

Da bei der vorliegenden Studie Kammerversuche mit den entsprechenden Kontrollen durchgeführt wurden, kann davon ausgegangen werden, daß die beobachteten Schädigungssymptome (mit Einschränkungen im Falle von *Fagus sylvatica*, siehe unten) tatsächlich auf die Einwirkung der Luftschadstoffe zurückzuführen sind und die Unterschiede im Schädigungsbild artspezifisch waren.

Wie bereits im Methodenteil erwähnt, wurden in der Vegetationsperiode 1996 Blatt- und Schildläuse in den Versuchskabinen beobachtet. Der starke Befall der Buchen-Pflanzen mit Blattläusen (*Phyllaphis fagi* L.) führte im Laufe der Zeit zu Vergilbungen und Blatteinrollungen. Bei *Fagus sylvatica* muß daher von einer Verminderung der Aussagekraft aller im Verlauf dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse ausgegangen werden. Da aber alle drei Versuchsvarianten mit Blattläusen befallen waren, erscheint zumindest eine Gegenüberstellung der Resultate der Immissionsstreß-Varianten mit den Kontrollen möglich. Die Buchen wurden aufgrund ihrer geringen Vitalität in der Vegetationsperiode 1997 nicht erneut beprobt.

Der Schildlausbefall betraf *Betula*- und *Sorbus*-Pflanzen bei fast allen Varianten im ersten Probenahme-Jahr, erwies sich aber als weit weniger dramatisch als der Blattlaus-Befall der Buchen, insbesondere da meist nur kleine, eng umgrenzte Abschnitte von Stamm und Zweigen betroffen waren und die überwiegende Mehrheit der Schildläuse durch die Insektizidbehandlungen abgetötet wurde. Im zweiten Probenahme-Jahr wurde kein erneuter Befall mit Schildläusen beobachtet.

4.3.2 Blattflächen und Trockensubstanzgehalt

Die Bestimmung der Blattflächen der Versuchspflanzen zeigte, daß alle drei Baumarten unter Schadstoffbelastung bereits in der ersten Probenahmeperiode signifikant kleinere Blätter als die entsprechenden Kontrollen hatten (T-Test, bei allen Varianten $p < 0,005$). Die Blattflächen der $\text{SO}_2 + \text{O}_3$ -Varianten waren außerdem geringfügig kleiner als die der SO_2 -Varianten. Dieser Unterschied war jedoch nur bei *Sorbus* signifikant (T-Test, $p = 0,008$). In der Abbildung 27 sind die gemessenen Blattflächen der Vegetationsperiode 1996 dargestellt.

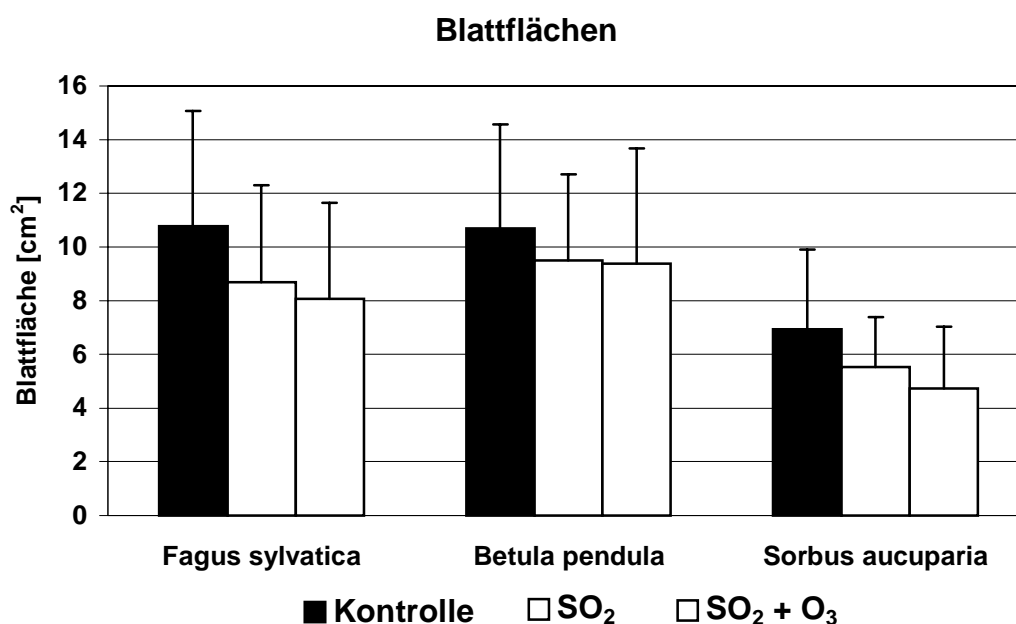


Abbildung 27: Einfluß der Begasung auf die Blattfläche. Die gemessenen Blätter wurden im ersten Probenahme-Jahr Ende Juli und Anfang September geerntet.

Die Streuung der Werte war, wie die Standardabweichungen zeigen, relativ hoch. Dies war jedoch aufgrund der naturgemäßen Vielfalt der Blattgrößen zu erwarten. Es wurde dementsprechend eine große Anzahl von Blättern vermessen, so daß die abgebildeten Säulen Mittelwerte aus mindestens 100, meist aber 150 bis 170 Einzelwerten wiedergeben.

Der Trockensubstanzgehalt der Blätter lag bei *Betula* und *Sorbus* zwischen 34% und 44%, bei *Fagus* zwischen rund 40% und 50% der Frischmasse. Bei diesem Parameter konnte kein Einfluß der Schadstoffbelastung festgestellt werden.

Die Unterschiede hinsichtlich der Blattflächen belegen vermutlich sowohl mittelfristige, als auch kurzfristige, systemische Auswirkungen der Schadstoffbelastung. Da die Begasung aus technischen Gründen in den Wintermonaten durch die Betreiber nicht ermöglicht werden konnte, sondern erst im April wieder einsetzte, ist die verringerte Blattfläche möglicherweise einerseits eine Folge der Begasung während der Knospenbildung im Spätsommer und Herbst des Vorjahres und andererseits ein Effekt der Begasung zum Zeitpunkt des Aufbrechens der Knospen und der Blattentwicklung. Letzteres würde eine ausgesprochen rasche Reaktion der Pflanzen auf die eingetretene Streßsituation bedeuten, da zu diesem Zeitpunkt insbesondere bei *Sorbus* und *Betula* eine schnelle Blattentwicklung bis zum Erreichen der endgültigen Größe stattfindet. Doch auch unter der Voraussetzung, daß hier die Auswirkungen der Begasung zum Zeitpunkt der Knospenbildung beobachtet wurden, war eine meßbare Verringerung der Blattflächen nicht unbedingt zu erwarten, da die Begasung im Vorjahr erst im August begann und zunächst mit geringeren Schadstoffkonzentrationen einsetzte (vgl. Tabelle 3, Kap. 3.1.1.1). Somit sind die vorliegenden Ergebnisse einerseits ein Zeichen für die systemische Wirkung der Luftschadstoffe und andererseits für die hohe Plastizität der untersuchten Baumarten hinsichtlich ihrer phänotypischen Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen.

4.3.3 Interzellularraum-Volumen unter Immissionsbelastung

Ein Vergleich der Schadgas-Varianten mit den jeweiligen Kontrollen zeigte, daß in vielen Fällen das Volumen der Interzellularräume bei den mit Luftschadstoffen behandelten Varianten geringer als bei den jeweiligen Kontrollen war (Abbildung 28a-c). Die Blätter der mit $\text{SO}_2 + \text{O}_3$ behandelten Pflanzen zeigten diesen Effekt besonders deutlich. Hier lagen die IZR-Volumina bei allen Proben nicht nur unter den Kontrollwerten, sondern auch unter den SO_2 -Werten. Die Blätter der mit SO_2 begasten Pflanzen hatten dagegen nur bei *Fagus sylvatica* deutlich geringere IZR-Volumina als die Kontrollen. Bei *Betula pendula* lagen nur die beiden Spätsommer-Werte unter den Kontroll-Werten, während die Spätsommer-Werte bei *Sorbus aucuparia* über denen der entsprechenden Kontrollen lagen. Die Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den Varianten sind in der Tabelle 11 wiedergegeben.

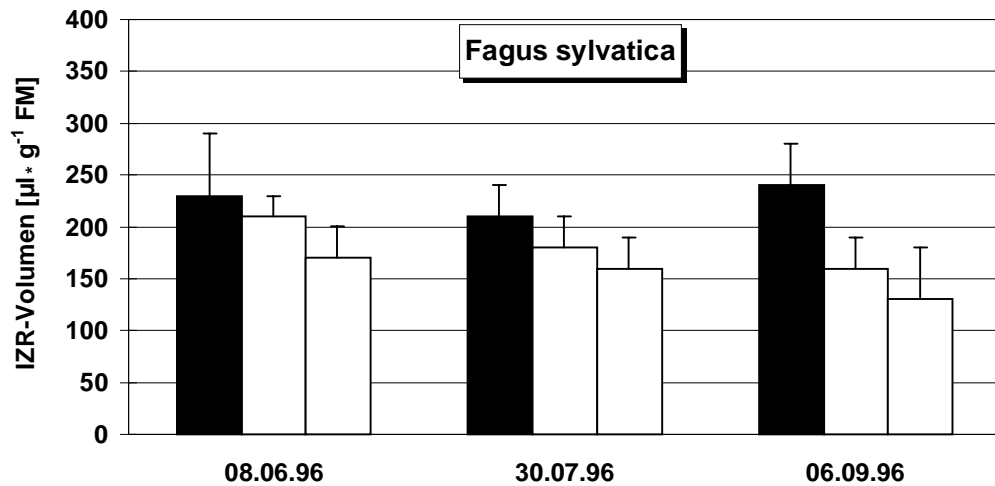


Abb. 28a

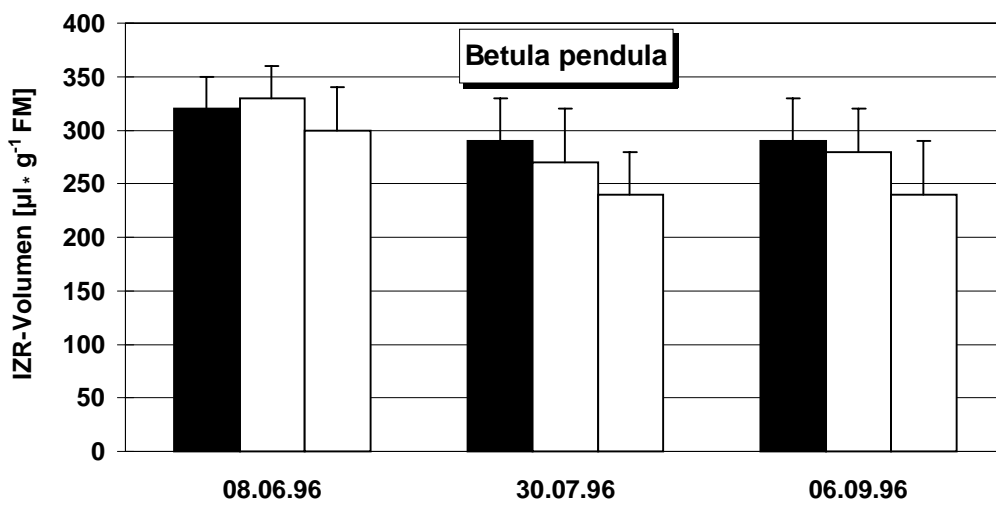


Abb. 28b

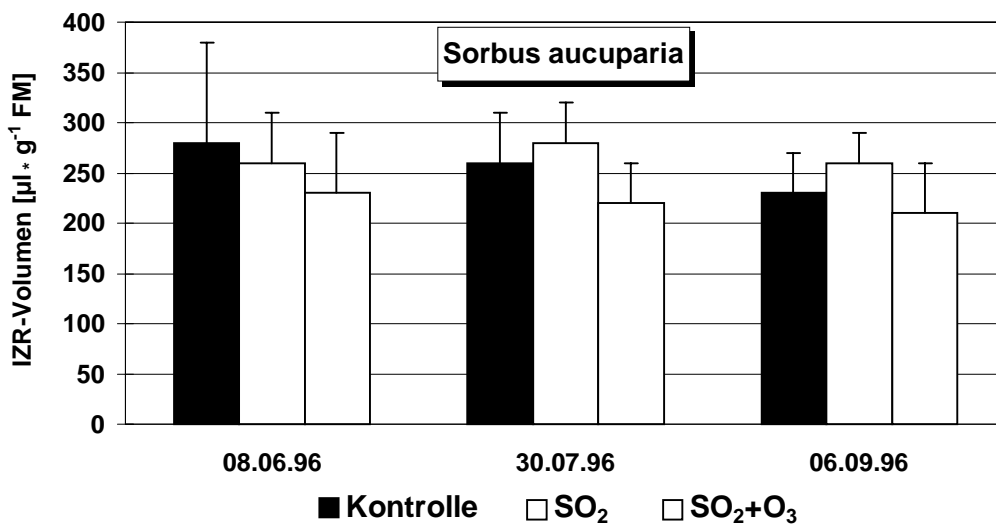


Abb. 28c

Abbildung 28a – c: Einfluß der Belastung mit Luftschadstoffen auf das Interzellularraum-Volumen der Blätter im ersten Probenahme-Jahr, nach 8, 15 und 20 Wochen Schadstoffbelastung. (n = 13-15 bei *Fagus*, n = 15-30 bei *Betula* und *Sorbus*).

Tabelle 11: Signifikanz der Unterschiede zwischen den Kontrollen und den schadstoffbelasteten Pflanzen sowie zwischen den beiden Schadstoff-Varianten hinsichtlich der IZR-Volumina der Blätter. Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit p mit Hilfe des U-Tests nach MANN und WHITNEY [1947]. Bei signifikanten Unterschieden ($p < 0,05$) wurden die Tabellenfelder grau hinterlegt.

	Irrtumswahrscheinlichkeit p		
verglichene Gruppen	K – SO ₂	K – SO ₂ + O ₃	SO ₂ – SO ₂ + O ₃
<u>Fagus sylvatica</u>			
Juni	0,450	0,016	0,008
Juli	0,015	< 0,001	0,018
September	< 0,001	< 0,001	0,026
<u>Betula pendula</u>			
Juni	0,516	0,111	0,111
Juli	0,199	0,002	0,093
September	0,128	0,001	0,018
<u>Sorbus aucuparia</u>			
Juni	< 0,001	< 0,001	0,072
Juli	0,200	0,001	< 0,001
September	0,001	0,097	< 0,001

Diese Ergebnisse unterstreichen die im vorhergehenden Kapitel getroffenen Aussagen und machen deutlich, daß die Schadstoffimmissionen nicht nur einen Einfluß auf die äußere Gestalt der Blätter haben, sondern auch eine innere Umstrukturierung der Blätter initiieren können. Es handelte sich hierbei offensichtlich um einen aktiven Prozeß, da in diese Untersuchungen zwar geschädigte, aber nicht stark nekrotisierte, Blätter mit funktionsfähigen Spaltöffnungen einbezogen wurden. Das Vorhandensein von großflächigen Nekrosen hätte aufgrund der angewendeten Infiltrationsmethode (vgl. Kap. 3.4) zu einer Verfälschung der Werte geführt.

Eine Verringerung des Volumens der Interzellularen könnte, durch die daraus resultierende verringerte Kontaktfläche der Mesophyllzellen mit den Luftschadstoffen, Bestandteil einer Streßvermeidungsstrategie sein.

Die unabhängig von der Behandlungsvariante vielfach zu beobachtende Tendenz zur Verringerung des Interzellularraum-Volumens im Verlauf der Vegetationsperiode muß vermutlich im Zusammenhang mit einer Verstärkung der Zellwände während des Reifungsprozesses der Blätter gesehen werden.

Bei der Blattprobenbearbeitung zur Bestimmung des Interzellularraum-Volumens wurde beobachtet, daß sich mit der Dauer der Begasung die Infiltrierbarkeit der Blätter verschlechterte. Besonders deutlich war dies bei *Fagus sylvatica* erkennbar und bei den mit SO₂ und Ozon begasten Pflanzen war der Effekt stärker ausgeprägt als bei den ausschließlich mit SO₂ behandelten. Die geringere Infiltrierbarkeit der Blätter weist auf eine verminderte

stomatäre Öffnungsweite hin und deutet ebenfalls auf eine Streßreaktion der Pflanzen. Die Ursachen für diese Reaktion müssen vermutlich in osmotischen Imbalancen durch veränderte Membranpermeabilität unter Schadstoffeinwirkung gesehen werden. Eine hierdurch bedingte Veränderung des zellulären Wasserpotentials kann den Spaltöffnungsverschluß zur Folge gehabt haben.

Die Funktionsfähigkeit der Spaltöffnungen blieb dabei jedoch weitestgehend erhalten, da sich nach Verlängerung der Belichtungszeit in der Waschlösung die Infiltrierbarkeit der Blätter wieder herstellen ließ. Die Bestimmung des Interzellularraum-Volumens war daher auch bei den begasten Pflanzen möglich.

4.3.4 Wuchsparameter

Die bei Abschluß des Versuches erhobenen Wuchsparameter (vgl. Kap. 3.10.4) sollten klären, ob und in welchem Ausmaß sich die Belastungssituation auf das gesamte Wuchsverhalten der Pflanzen ausgewirkt hatte.

Bei den aus den Kammern entnommen Pflanzen wurden die Gesamthöhe der Pflanzen, der Stammdurchmesser und die Frischmasse der oberirdischen Pflanzenteile im blattlosen Zustand bestimmt. In diese Untersuchungen wurden die Buchen-Pflanzen aufgrund der starken Schädigung durch *Phyllaphis fagi* nicht einbezogen.

Die Abbildung 29 und die Abbildung 30 geben zunächst die Wuchshöhen von *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* wieder. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden die Pflanzen in acht Gruppen unterschiedliche Höhe eingeteilt. Der Höhenunterschied zwischen den Gruppen beträgt jeweils 50 cm.

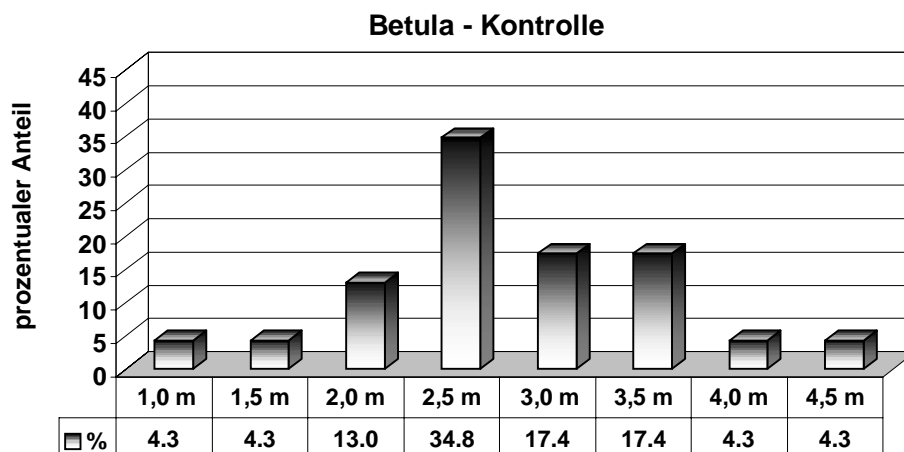


Abb. 29a

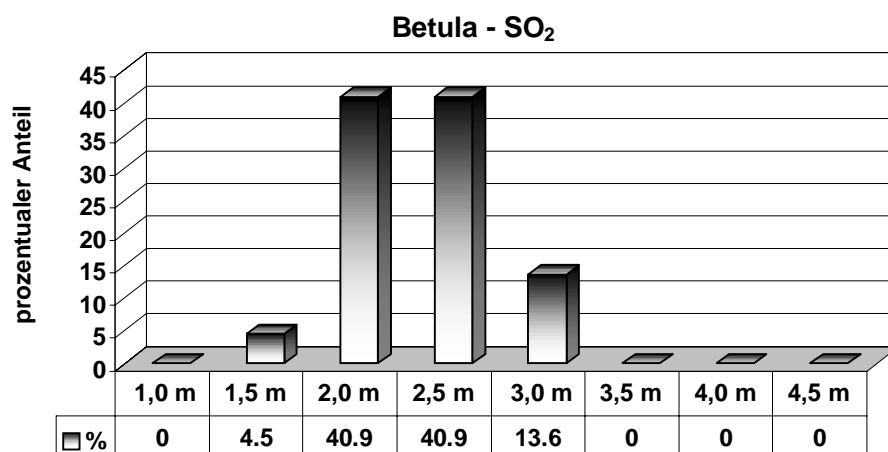


Abb. 29b

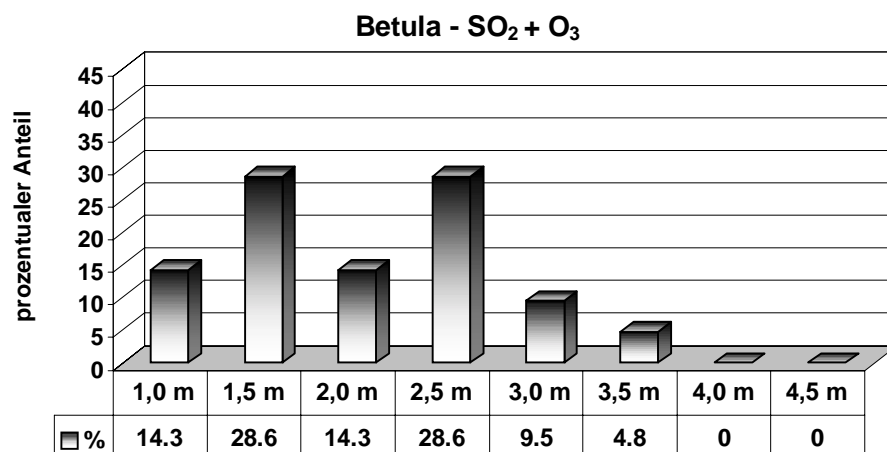


Abb. 29c

Abbildung 29a bis c: Wuchshöhen der Birken-Pflanzen im OTC-Versuch. Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Höhenklassen in den drei Behandlungsvarianten. (Die Säulen geben den prozentualen Anteil der Pflanzen in der jeweiligen Höhenklasse an der Gesamtheit aller Pflanzen der Behandlungsvariante an.)

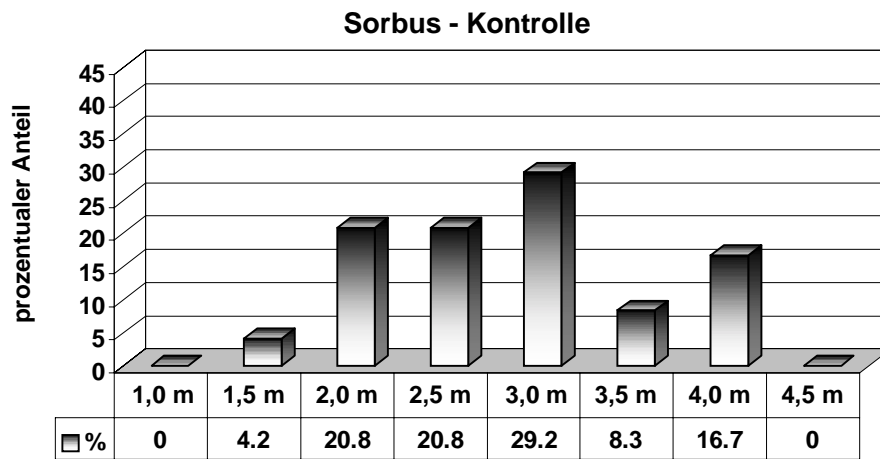


Abb. 30a

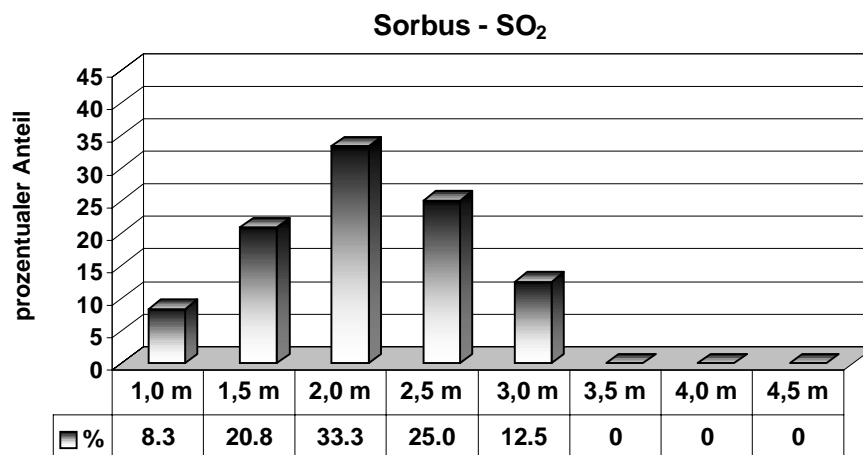


Abb. 30b

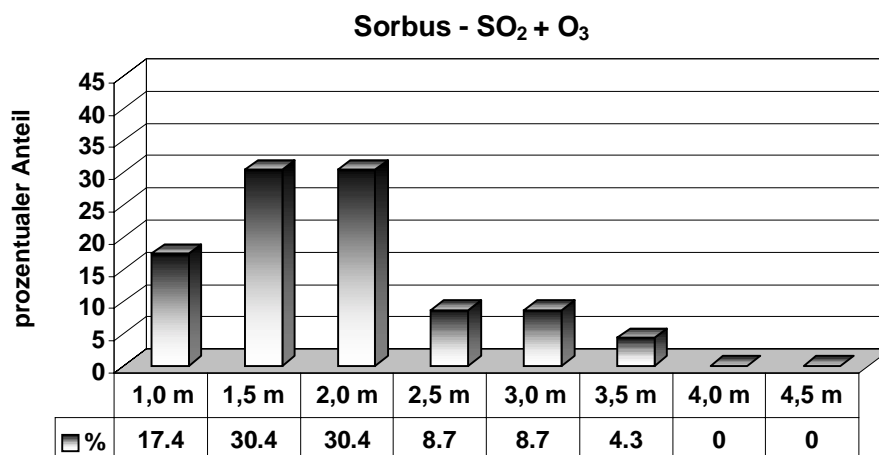


Abb. 30c

Abbildung 30a bis c: Wuchshöhen der Ebereschen im OTC-Versuch. Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Höhenklassen in den drei Behandlungsvarianten.

Ein Vergleich der verschiedenen Behandlungsvarianten miteinander macht die Unterschiede im Höhenwachstum deutlich. Bei *Betula* waren 43% der Kontroll-Pflanzen höher als 2,50 m, bei den beiden anderen Versuchsgruppen war dies nur noch bei 14% der Fall. Keine der SO₂-belasteten Pflanzen war höher als 3 m und bei den mit der Schadgaskombination behandelten Pflanzen waren lediglich 5% höher als 3 m, während der Anteil bei den Kontrollen noch 25% betrug.

Bei den Ebereschen erreichten 54% der Kontroll-Pflanzen eine Höhe von über 2,50 m, während es bei den beiden andern Varianten nur noch je 13% waren. Höhen über 3 m erreichten nur noch 4% der SO₂+O₃-Pflanzen, dagegen 25% der Kontroll-Variante. Bei den Kontroll-Pflanzen waren zudem noch 17% höher als 3,50 m, während diese Höhe von keiner Pflanze der beiden anderen Varianten erreicht wurde.

Bei beiden Baumarten war der Anteil sehr kleiner Pflanzen (bis 1,50 m) bei den SO₂+O₃-Varianten am höchsten.

Ähnliche Auswirkungen hatte die Begasung auf die Massenzunahme der Pflanzen. Die Abbildung 31 und die Abbildung 32 zeigen die Frischmassen der oberirdischen Anteile der Pflanzen im blattlosen Zustand. Adäquat zur Darstellung der Wuchshöhen erfolgte hier ebenfalls eine Einteilung in Gruppen. Die Bestimmung der Masse der oberirdischen Anteile ergab, daß bei der Kontroll-Variante von *Betula* 38% der Pflanzen eine Frischmasse von über 200 g erreichten, während dies in der SO₂-Variante nur noch bei etwa 18% und in der SO₂+O₃-Variante bei etwa 24% der Fall war. Noch deutlicher waren die Unterschiede bei *Sorbus*. Bei den Kontrollen erreichten etwa 67% der Pflanzen eine Frischmasse von mehr als 200 g, während es bei den Luftschadstoff-Varianten nur noch rund 21% (SO₂) bzw. 17% (SO₂+O₃) waren. Auffällig war bei dieser Baumart auch der hohe Anteil der Pflanzen über 600 g bei den Kontrollen, der hier mehr als 30% betrug, während er bei den beiden anderen Varianten 4% nicht überstieg.

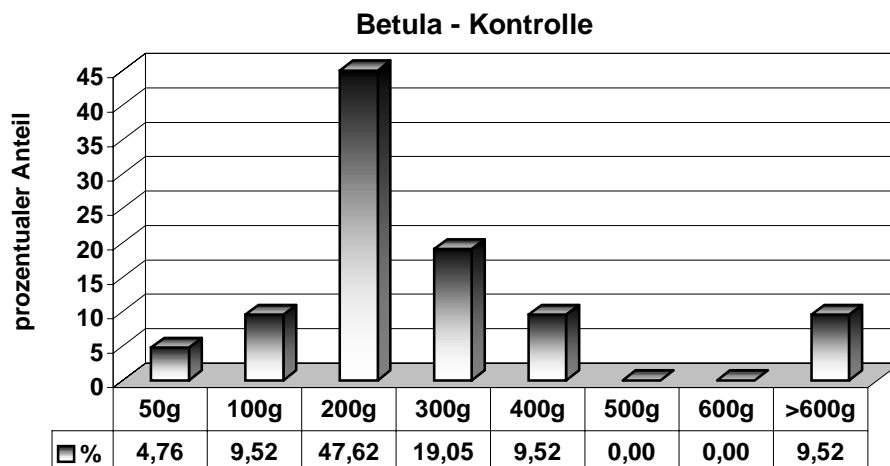


Abb. 31a

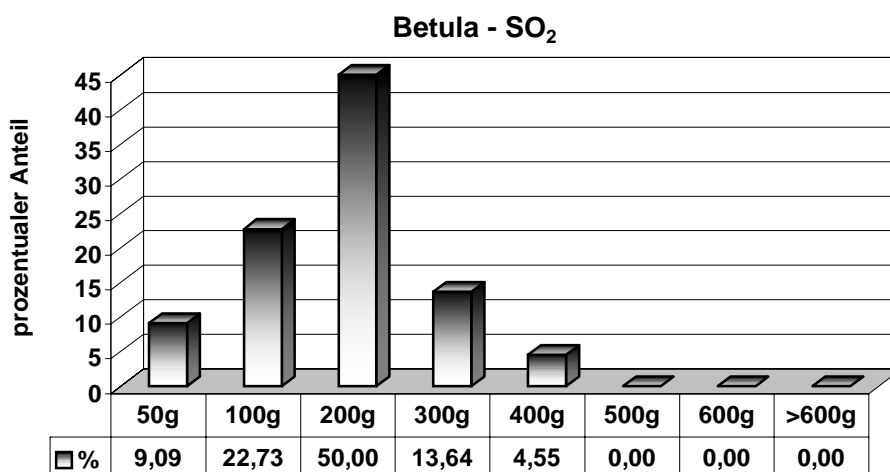


Abb. 31b

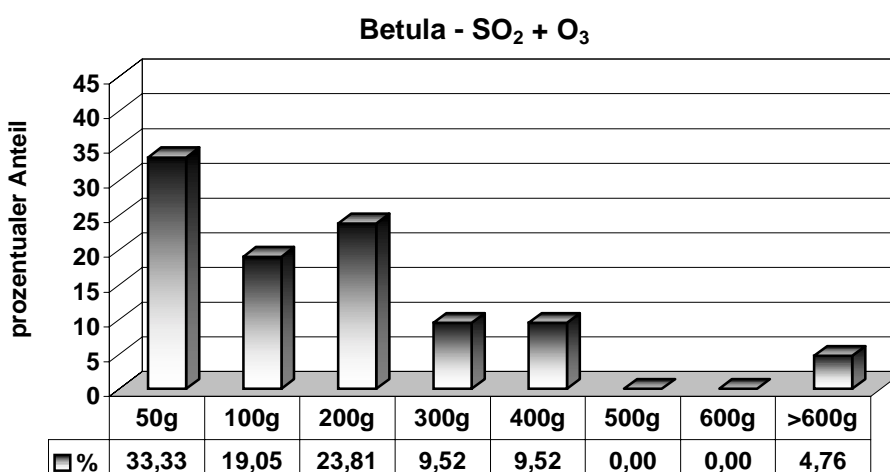


Abb. 31c

Abbildung 31a bis c: Frischmassen der oberirdischen Anteile der Birken im unbelaubten Zustand. Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Klassen in den drei Behandlungsvarianten.

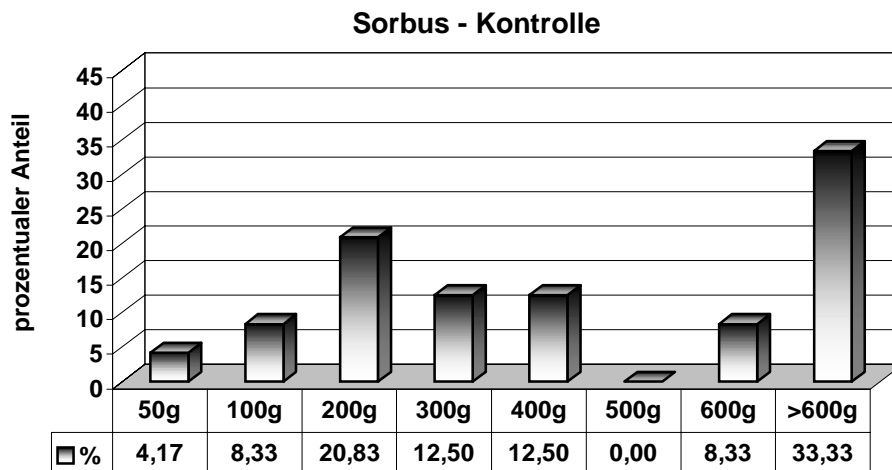


Abb. 32a

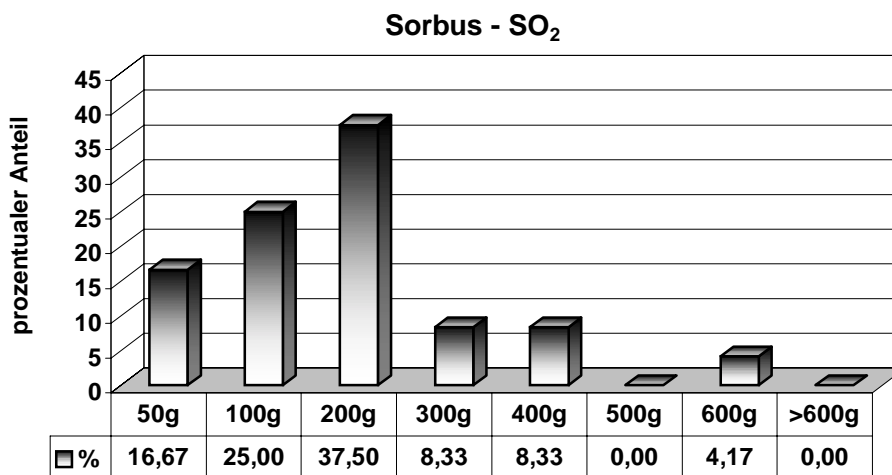


Abb. 32b

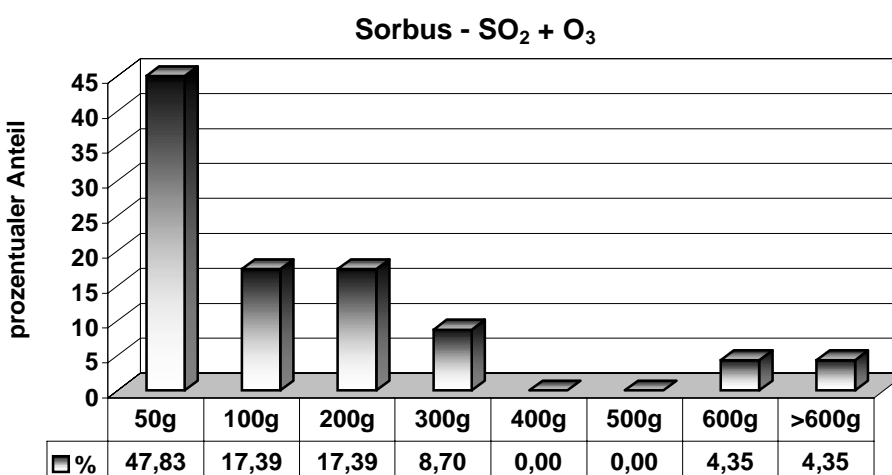


Abb. 32c

Abbildung 32a bis c: Frischmassen der oberirdischen Anteile der Ebereschen im unbelaubten Zustand. Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Klassen in den drei Behandlungsvarianten.

Auch die Bestimmung des Durchmessers der Stammbasis ergab ähnliche Resultate. Bei *Betula* erreichten mehr als 40% der Kontroll-Pflanzen einen Durchmesser von mehr als 1,5cm, während es bei der SO₂-Variante weniger als 30% und bei der SO₂+O₃-Variante nur rund 25% waren. Bei *Sorbus* zeigten sich diese Tendenzen wiederum noch deutlicher, hier hatten etwa 65% der Kontroll-Pflanzen einen Stammdurchmesser von mehr als 1,5 cm, während es bei den Schadgas-Varianten nur noch rund 40% (SO₂) bzw. 25% (SO₂+O₃) waren.

Die Zusammenstellung dieser Resultate belegt eindeutig, daß sich die Belastung mit Luftschadstoffen nicht nur auf die intensiv betroffenen Assimilationsorgane auswirkte, sondern das gesamte Wuchsverhalten der Pflanzen beeinträchtigte. Die chronische Belastung mit Schwefeldioxid und Ozon hatte innerhalb der vergleichsweise kurzen Zeit von zweieinhalb Jahren eine deutliche Wuchsdepression zur Folge. Dabei wirkte sich die Schadstoffbelastung insgesamt bei *Sorbus* deutlicher aus als bei *Betula* und die Begasung mit dem SO₂-Ozon-Gemisch hemmte das Wachstum stärker als die Belastung mit SO₂ allein.

Über die Auswirkungen einer kombinierten Belastung mit SO₂ und O₃ wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Eine ausführliche Zusammenstellung verschiedener Arbeiten zu dieser Problematik findet sich bei GUDERIAN et al. [1985]. Bei verschiedenen Spezies (wie z.B. *Glycine*, *Populus*, *Nicotiana* oder *Medicago*) wurde ein reduziertes Wachstum bzw. eine verringerte Trockenmasse beobachtet. Die Effekte von Schadstoffkombinationen wurden zumeist als additiv oder stärker als additiv beschrieben.

Für die gefundene Wuchsdepression sind vermutlich sowohl die Schädigung der Blätter (Chlorosen und Nekrosen, Schädigung der Stomata) und damit eine verschlechterte Assimilationsleistung, als auch möglicherweise ein höherer Energie und Assimilat-Verbrauch der Pflanzen für einen intensiven Streßmetabolismus verantwortlich zu machen. Die geringere Blattfläche könnte hier ebenfalls eine Rolle gespielt haben.

Eine Bewertung dieser Ergebnisse im Hinblick auf den Anbau der beiden Baumarten im Osterzgebirge muß mehrere Teilaspekte berücksichtigen.

Die angewendeten Schadstoffkonzentrationen treten im Osterzgebirge auf, lagen jedoch relativ hoch (vgl. Tabelle 2, Kap. 1.1). Die Belastung mit diesen Konzentrationen erfolgte kontinuierlich über die gesamte Wachstumsperiode hinweg. Dies entspricht nicht den Freilandverhältnissen, diente jedoch dem Ziel der Studie, verschiedene Streßreaktionen der Pflanzen innerhalb eines Zeitraumes von zweieinhalb Jahren zu untersuchen. Es ist demnach anzunehmen, daß die beobachtete Wuchsdepression unter Freilandbedingungen nicht mit dieser Deutlichkeit auftreten würde.

Die Untersuchungen lassen aber auch erkennen, daß beiden Baumarten selbst unter diesen Verhältnissen ein, wenn auch eingeschränktes, Wachstum möglich war, da die Pflanzen mit einer Höhe von rund 70 bis 100 cm in die Open-Top-Kammern eingesetzt worden waren und auch unter Schadstoffbelastung zu über 50% eine Höhe von 2 m und mehr erreichten. Die in den mittleren und höheren Lagen des Erzgebirges durchschnittlich geringere und diskontinuierliche Luftbelastung mit Schwefeldioxid und Ozon muß demzufolge zwar als bedeutender Streßfaktor angesehen werden, dürfte aber bei an die Standorte angepaßten Pflanzen vermutlich nur in Verbindung mit weiteren Streßfaktoren, wie beispielsweise Trockenheit, Spätfrost oder Befall mit Pathogenen zu größeren Ausfällen im Freiland führen. In diesem Zusammenhang wirkt sich die größere Frostresistenz der Ebereschen im Vergleich zu den Birken vorteilhaft auf die Eignung dieser Baumart als Vorwaldbaumart aus.

Hinsichtlich der Nutzung von *Betula pendula* für den Anbau im Osterzgebirge muß eine mögliche Prädisposition gegenüber dem Befall mit pathogenen Pilzen unter ungünstigen

Umweltbedingungen berücksichtigt werden. Neuere Erkenntnisse zum sogenannten „Birkensterben“ im Erzgebirge deuten auf solche Zusammenhänge hin. Bei den geschädigten Birken (nur *Betula pendula*) wurden braune Flecken auf den Blättern, Stammrisse, Spitzendürre und Verkahlungen im Kronenbereich festgestellt. Die Blattveränderungen konnten dabei eindeutig auf einen Befall mit dem Pilz *Marssonina betulae* zurückgeführt werden. Eine Befallsrate von teilweise bis zu 95% der Birken in Forstrevieren der höheren Lagen weist auf die Bedeutung dieser Pilzinfektion hin. Nach bisherigen Erkenntnissen tritt eine Infektion der Blätter mit *Marssonina betulae* bevorzugt an vorgeschädigten Bäumen auf und erschwert oder verhindert die Regeneration der Bäume nach Streßereignissen. In welchem Maße die Immissionsbelastung im Erzgebirge und/oder Spätfröste prädisponierend wirkten, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, da ausführlichere Untersuchungen hierzu erst seit 1999 durchgeführt werden [BÄUCKER, 2000]. Es ist jedoch zu vermuten, daß zumindest ein Zusammenspiel beider Faktoren eine Vorschädigung der Birken bewirkte.

Im Zusammenhang mit diesen vorläufigen Erkenntnissen erscheint es sinnvoll, in künftige Untersuchungen an Vorwaldbaumarten mit ähnlichen Zielstellungen auch die Baumart *Betula pubescens* einzubeziehen, die ebenso wie *Betula pendula* anspruchslos hinsichtlich der Klima- und Bodenverhältnisse ist [INSTITUT FÜR WALDBAU GÖTTINGEN, 1992], aber im Erzgebirge nicht von *Marssonina* befallen wurde.

4.3.5 Chlorophyllgehalt

Wie die in Abbildung 33 und Abbildung 34 dargestellten Mittelwerte der Chlorophyllgehalte der OTC-Pflanzen verdeutlichen, hatte die Einwirkung der Schadgase in beiden Varianten und bei allen Baumarten eine deutliche Verminderung des Gesamtchlorophylls der Blätter zur Folge. Bei *Fagus* und *Betula* waren die Chlorophyllgehalte am Beginn der Vegetationsperiode 1996 in den drei Versuchsvarianten zunächst ähnlich, im weiteren Verlauf wurde jedoch ein signifikanter Abfall der Chlorophyll-Werte bei den Schadgas-Varianten beobachtet.

Bei *Sorbus aucuparia* waren die Chlorophyllgehalte der Blätter mit Schadgasen behandelter Pflanzen bereits am Beginn der ersten Probenahmeperiode signifikant niedriger als diejenigen der Kontrollen (SO₂: etwa 40%, SO₂+O₃: fast 50% niedriger). Auch bei dieser Baumart vergrößerte sich die Differenz zwischen den Kontrollen und den begasten Pflanzen im Verlauf der Vegetationsperiode.

Im zweiten Probenahme-Jahr wurden auch bei *Betula* bereits Anfang Juni unter Schadgaseinwirkung deutlich niedrigere Chlorophyllwerte gemessen. Hier waren die Chlorophyllgehalte der Schadgas-Varianten um etwa 32-35% niedriger als die der vergleichbaren Kontrollen. Bei *Sorbus* waren die Pigmentgehalte Anfang Juni um rund 47% (SO₂), bzw. um etwa 25% (SO₂+O₃) geringer.

Ende August 1997 betrug der Chlorophyllgehalt der mit SO₂ behandelten Birken etwa 60% und der mit SO₂+O₃ behandelten Birken nur noch rund 50% der Kontrollen. Bei *Sorbus aucuparia* war der Unterschied noch wesentlich deutlicher ausgeprägt. Die mit SO₂ behandelten Pflanzen hatten noch etwa 30% des Chlorophyllgehaltes der Kontrollen und die Pflanzen unter SO₂+O₃-Belastung rund 40%.

Die Unterschiede zwischen den Kontrollen und den mit Schadstoffen behandelten Pflanzen waren demnach insgesamt in der zweiten Probenahmeperiode deutlicher ausgeprägt als in der ersten. Die Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind für beide Jahre in der Tabelle 12 dargestellt.

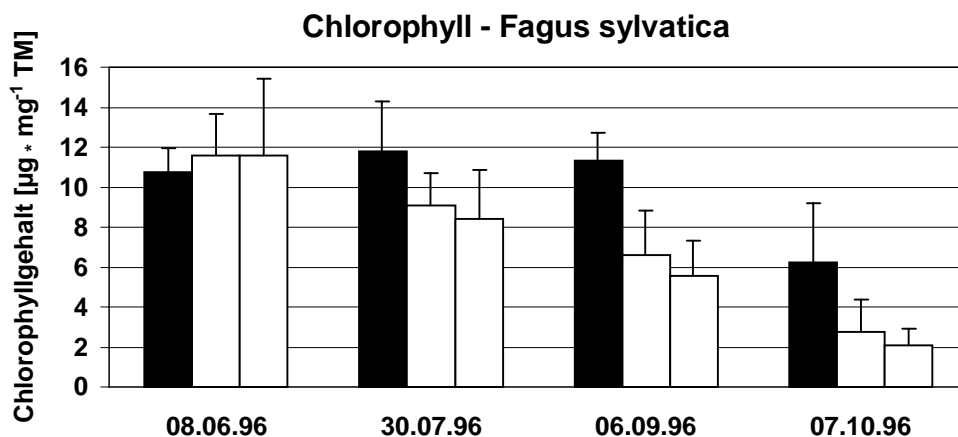


Abb. 33a

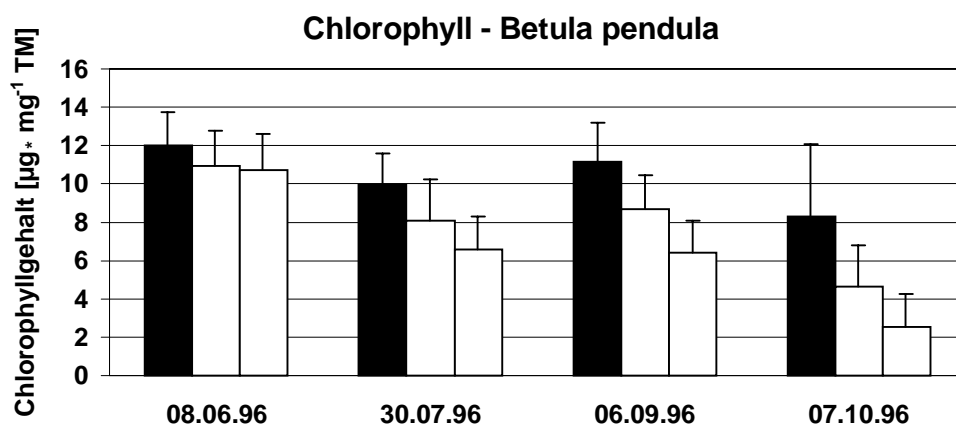


Abb. 33b

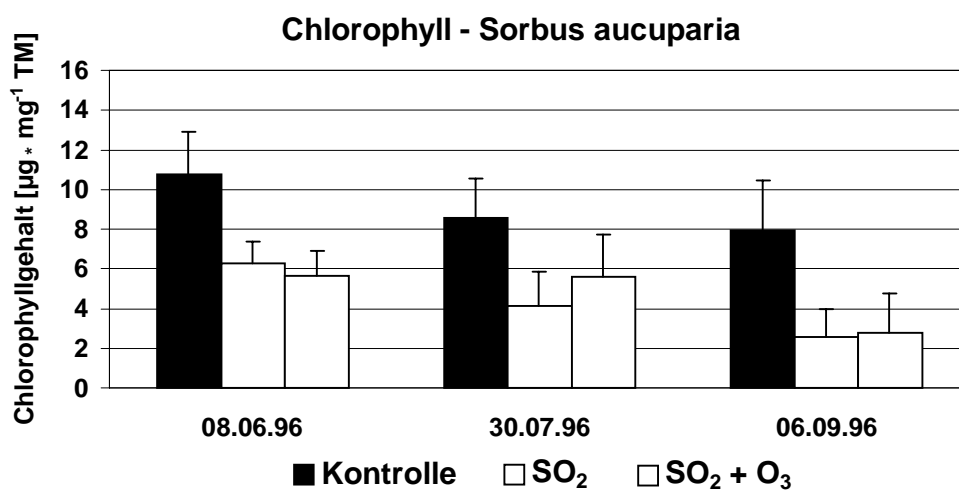


Abb. 33c

Abbildung 33 a - c: Chlorophyllgehalte der Blätter der Versuchspflanzen nach 8, 15 und 20 Wochen Schadstoffbelastung im ersten Probenahme-Jahr (Mittelwerte aus 12 bis 15 Einzelmessungen, Bezugsbasis Trockenmasse). Bei den analysierten Blattproben handelte es sich um voll belichtete Blätter, die aus der Kronenmitte entnommen wurden.

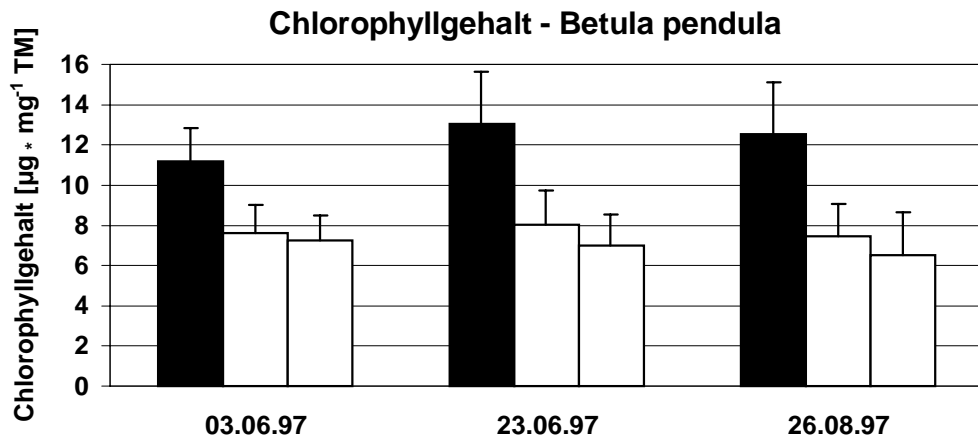


Abb. 34a

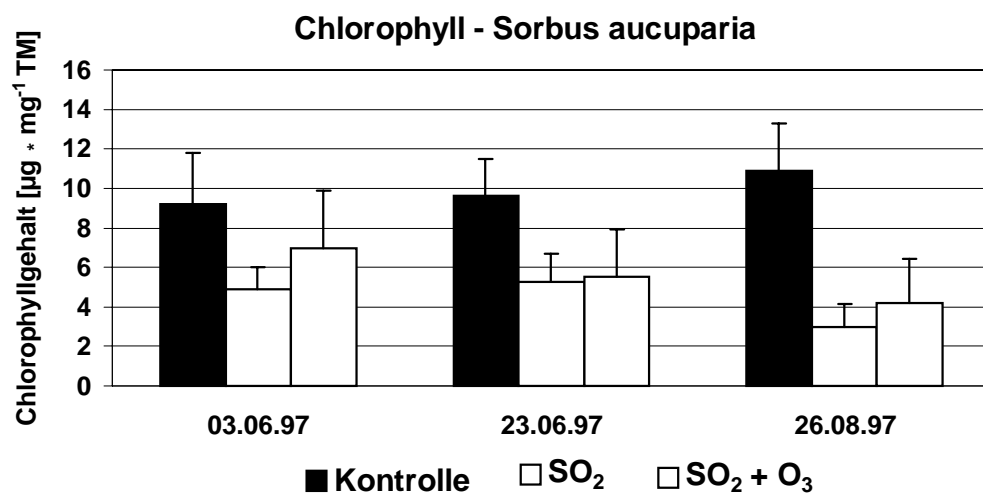


Abb. 34b

Abbildung 34 a und b: Chlorophyllgehalte der Blätter der Versuchspflanzen nach 5, 8 und 17 Wochen Schadstoffbelastung im zweiten Probenahme-Jahr. (Mittelwerte aus jeweils 12 bis 15 Einzelmessungen.)

Tabelle 12: Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den Kontrollen und den schadstoffbelasteten Pflanzen sowie zwischen den beiden Schadstoff-Varianten hinsichtlich der Chlorophyllgehalte der Blätter in beiden Probenahmeperioden. Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit p mit Hilfe des U-Tests nach MANN und WHITNEY [1947]. Bei signifikanten Unterschieden ($p < 0,05$) wurden die Tabellenfelder grau hinterlegt.

verglichene Gruppen	Irrtumswahrscheinlichkeit p		
	K – SO ₂	K – SO ₂ + O ₃	SO ₂ – SO ₂ + O ₃
<u>Fagus sylvatica</u>			
8.6.96	0,545	0,778	0,622
30.7.96	0,021	0,007	0,184
6.9.96	< 0,001	< 0,001	0,325
7.10.96	0,007	0,003	0,273
<u>Betula pendula</u>			
8.6.96	0,166	0,106	0,862
30.7.96	0,028	< 0,001	0,106
6.9.96	0,015	< 0,001	0,005
7.10.96	0,013	0,001	0,022
3.6.97	< 0,001	< 0,001	0,644
24.6.97	< 0,001	< 0,001	0,078
26.8.97	< 0,001	< 0,001	0,256
<u>Sorbus aucuparia</u>			
8.6.96	< 0,001	< 0,001	0,174
30.7.96	< 0,001	0,001	0,035
6.9.96	< 0,001	< 0,001	0,950
3.6.97	< 0,001	0,033	0,050
23.6.97	< 0,001	< 0,001	0,950
26.8.97	< 0,001	< 0,001	0,127

Die Pigmentausbleichung ist in der Regel eines der deutlichsten Schadsymptome unter dem Einfluß von SO₂ und /oder Ozon. Eine Schädigung der Photosynthesepigmente erfolgt nach bisherigen Erkenntnissen vordergründig über radikalvermittelte oxidative Prozesse, die durch beide Schadstoffe initiiert werden können und insbesondere durch den Angriff auf die Doppelbindungen in den Pigmentmolekülen zu deren Abbau führen (vgl. Kap. 1.2 und 1.3). Die Beeinträchtigung der Membranintegrität aufgrund von Lipidperoxidation spielt ebenfalls eine wichtige Rolle [HÄLLGREN, 1978; SCHLEE, 1992; PENTTILÄ et al., 1996; HEATH und TAYLOR, 1997].

Eine Überlastung von Entgiftungs- und Reparaturmechanismen aufgrund des kontinuierlichen Schadstoffeintrages in die Pflanzen trug in der vorliegenden Studie vermutlich erheblich zum dramatischen Abfall des Chlorophyllgehaltes der Blätter bei.

4.3.6 pH-Werte und Pufferkapazitäten der Blatthomogenate

Die 1997 mit *Betula* und *Sorbus* durchgeführten Versuche mit Gesamtblatt-Homogenaten sollten Aufschluß über deren pH-Wert und Pufferkapazität bei definierter Protonenzufuhr geben.

Die gemessenen pH-Werte der Blatthomogenate lagen deutlich im sauren Bereich und waren bei den Birkenblättern etwas niedriger als bei den Ebereschen (Tabelle 13). Bei *Betula* waren die pH-Werte der Blatthomogenate der SO₂-belasteten Blätter signifikant niedriger als diejenigen der Kontrollen (U-Test, $p = 0,007$). Bei *Sorbus* wurde bei den mit SO₂ und Ozon begasten Pflanzen ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen festgestellt (U-Test, $p = 0,02$). Die anderen Varianten unterschieden sich nicht deutlich von den Kontrollen.

Tabelle 13: pH-Werte der Blatthomogenate von *Betula* und *Sorbus* Anfang September 1997. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 6-7 Parallelmessungen.

Behandlungsvariante	<i>Betula pendula</i>	<i>Sorbus aucuparia</i>
Kontrolle	5,39 ± 0,09	5,66 ± 0,02
SO ₂	5,10 ± 0,22	5,64 ± 0,07
SO ₂ + O ₃	5,30 ± 0,15	5,53 ± 0,06

Der pH-Wert des Cytoplasmas liegt in der Regel etwa bei pH 7,0 bis 7,5 [SMITH und RAVEN, 1979, FELLE und BERTL, 1986]. Durch das Vorhandensein membranumhüllter Kompartimente ergeben sich jedoch lokale Unterschiede. Der *in vivo* pH-Wert von Chloroplasten liegt beispielsweise etwa bei 7,5, in belichteten Chloroplasten kann er bis pH 8 ansteigen [HELDT et al. 1973; OJA et al., 1986]. Der pH-Wert von Vakuolen ist dagegen in der Regel wesentlich niedriger, da in den Vakuolen organische Säuren akkumuliert werden und durch Protonenpumpen in der Vakuolenmembran Protonen aus dem Cytoplasma in die Vakuole transportiert werden können [GYENES, 1981; MATHIEU et al., 1986, GUERN et al., 1986; OJA et al., 1999].

Die in der Tabelle 13 dargestellten Ergebnisse resultieren aus pH-Wert-Messungen an Gesamtblatt-Homogenaten. Diese beinhalten demzufolge auch Zellwände, aufgebrochene Chloroplasten und den Inhalt der Vakuolen, der aufgrund der Größe dieser Organellen einen hohen Volumenanteil hat. Die pH-Werte der Blatthomogenate dürften demzufolge in erheblichem Maße von der Zusammensetzung des Vakuoleninhaltes beeinflusst gewesen sein [vgl. auch PFANZ und HEBER, 1989]. Erwartungsgemäß lagen die gefundenen pH-Werte aus diesem Grunde deutlich im sauren Bereich. Sie spiegeln jedoch nicht den unter physiologischen Gesichtspunkten bedeutsamen pH-Wert des Cytoplasmas bzw. der Chloroplasten wider. Dieser Umstand muß als Nachteil der angewendeten Methode angesehen werden. Da die Verringerung des pH-Wertes unter Schadstoffeinfluß jedoch in

keinem Falle mehr als 0,3 pH-Einheiten betrug, kann aufgrund der oben angeführten Überlegungen davon ausgegangen werden, daß die Wirkung des Schwefeldioxids nicht zu einer drastischen Ansäuerung der Zellen führte.

Die Pufferkapazitäts-Messungen an den Blatthomogenaten liefern darüber hinaus Aussagen über den Gesamtgehalt an puffernden Substanzen und deren Pufferungsvermögen in den verschiedenen pH-Bereichen.

Bei Titration des pH-Wertes der Homogenate vom voreingestellten pH 10 auf pH 3 (beispielhaft dargestellt in Abbildung 35) war der Gesamtverbrauch an Säureäquivalenten pro Gramm Frischmasse bei *Sorbus* im Mittel um etwa 35 bis 50% höher als bei den jeweiligen Birkenblatt-Homogenaten (Abbildung 36). Der Gesamtgehalt an puffernden Substanzen in den Blättern war demzufolge bei den Ebereschen deutlich höher als bei den Birken.

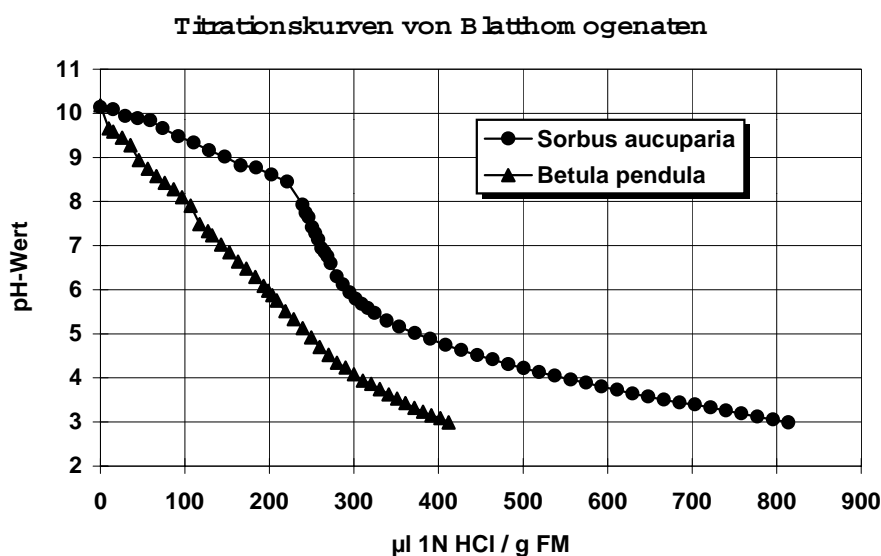


Abbildung 35: Titrationskurven jeweils eines Blatthomogenates von *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* (Kontroll-Pflanzen). Sie zeigen die Veränderung des pH-Wertes bei Zugabe von Aliquots 1 N HCl

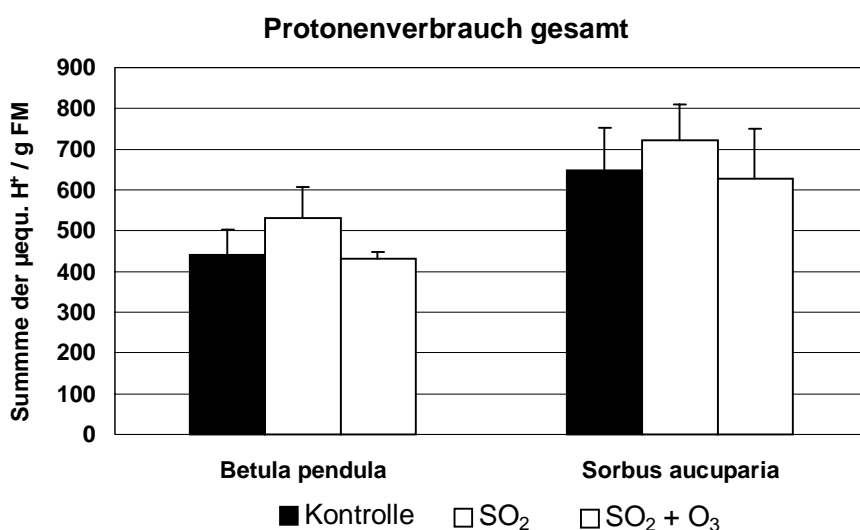


Abbildung 36: Gesamtverbrauch an Protonen bei Titration von pH 10 auf pH 3 bezogen auf die eingesetzte Blatt-Frischmasse (Werte gemittelt aus jeweils 6 bis 7 Einzelmessungen).

Der leicht erhöhte Gesamtverbrauch an Säureäquivalenten bei den SO_2 -Varianten beider Baumarten deutet auf ein Vorhandensein adaptiver Mechanismen gegenüber der erhöhten Säurefracht im Blattmesophyll hin. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant und anhand der Auftragung der Teilmengen an Säureäquivalenten die über den titrierten Bereich benötigt wurden, ließ sich dieser Befund ebenfalls nicht untermauern (Abbildung 37 a und b). Hier wurden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsvarianten gefunden. Die Auftragung ergab bei beiden Baumarten relativ niedrige Pufferkapazitäten im Bereich zwischen pH 5,5 und pH 7,5. Oberhalb und insbesondere unterhalb dieses Bereiches waren die Pufferkapazitäten bei beiden Baumarten höher, wobei die Anstiege bei *Sorbus* wesentlich steiler als bei *Betula* waren. Der höhere Gesamtverbrauch an Säureäquivalenten bei *Sorbus* lag demzufolge hauptsächlich in den hohen Pufferkapazitäten im Bereich zwischen pH 3,5 und pH 5 und zwischen pH 8 und pH 9 begründet.

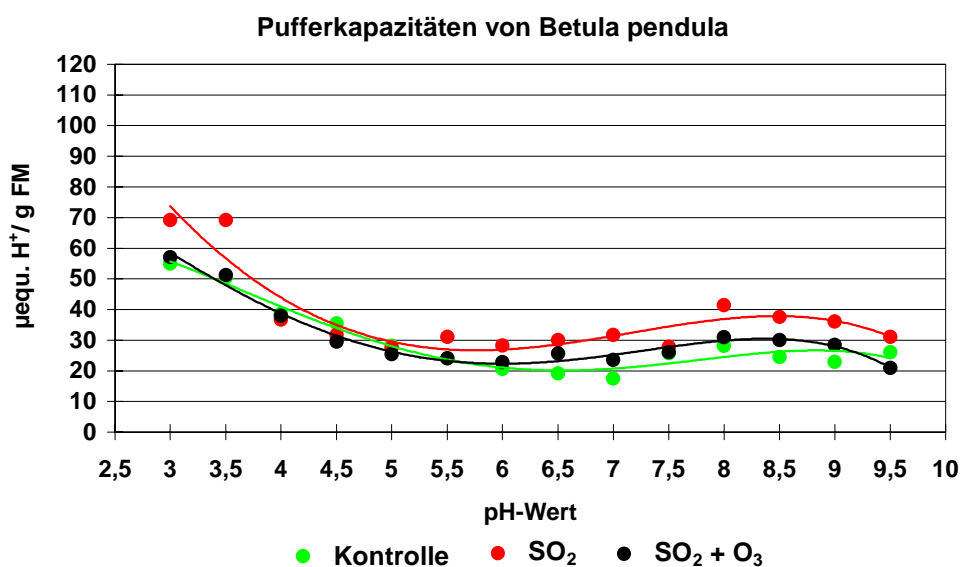


Abb. 37a

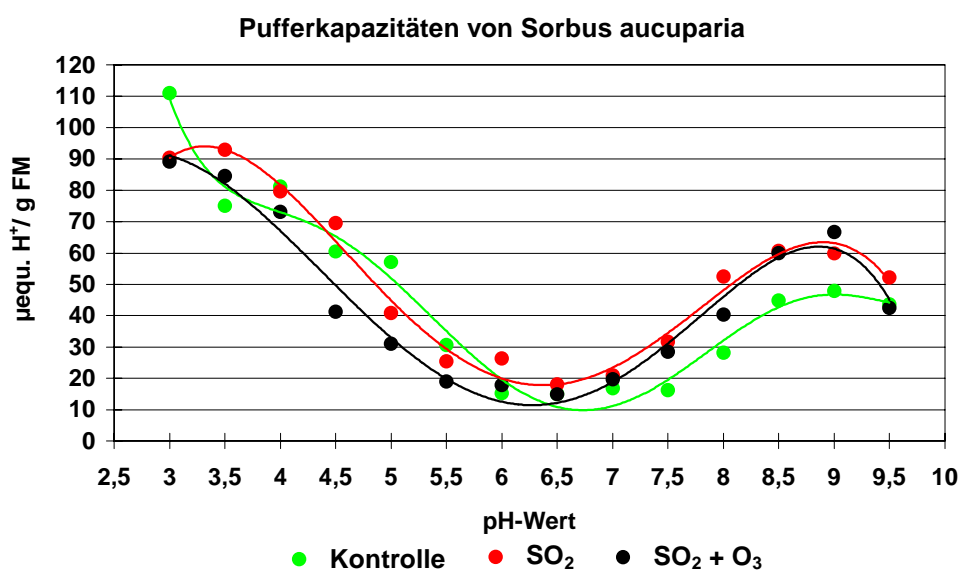


Abb. 37b

Abbildung 37 a und b: Pufferkapazitäten homogenisierter Blätter von *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* aus den Open-Top-Kammern. Aufgetragen ist der zur Verschiebung um jeweils 0,5 pH-Einheiten benötigte Protonenverbrauch über den gesamten titrierten pH-Bereich. Die dargestellten Werte sind jeweils Mittelwerte aus 6 bis 7 Parallelmessungen.

Dem Pufferungsvermögen der Zellen gegenüber pH-Wert-Veränderungen kommt unter dem Einfluß ansäuernd wirkender Luftschadstoffe große Bedeutung zu, da die Regulation des intrazellulären pH-Wertes eine maßgebliche Voraussetzung für die Funktion des pflanzlichen Stoffwechsels ist. Insbesondere die Aufrechterhaltung von Protonengradienten, der Transport von Ionen und die Steuerung enzymatischer Aktivitäten sind von einer strengen Kontrolle der Protonenkonzentration abhängig [NIEBOER et al., 1984].

Das Pufferungsvermögen der Zellen hängt von der Konzentration der puffernden Substanzen und von deren pK-Werten ab. Zu den wichtigsten Verbindungen mit Puffer-Eigenschaften gehören Phosphate, Polysaccharide, freie Aminosäuren wie z.B. Histidin und Cystein oder Peptide (z.B. Cystin) und Proteine sowie organische Säuren [SMITH und RAVEN, 1979; PFANZ und HEBER, 1986; PFANZ, 1987]. Einer Ansäuerung des Cytoplasmas entgegenwirken können auch OH⁻-Ionen, die bei der Reduktion von Nitrat entstehen [PFANZ und VOLLRATH, 1993].

Aufgrund der Ergebnisse der Pufferkapazitäts-Messungen muß davon ausgegangen werden, daß die Schadstoffbelastung nicht zu einer generellen Veränderung der Menge und Zusammensetzung der puffernden Substanzen in den Blattzellen führte. Mit der angewendeten Methode kann jedoch keine Aussage über aktuell ablaufende cytoplasmatische Entgiftungsmechanismen wie beispielsweise den oben beschriebenen Protonenexport in die Vakuole bzw. in den Apoplasten, oder die Verlagerung von Sulfat in die Vakuole [KAISER et al., 1989, ZIMMERMANN et al., 1999] getroffen werden, so daß die aktuelle Belastungssituation des Cytoplasmas nicht adäquat wiedergegeben wird.

Der niedrigere pH-Wert der Blatthomogenate bei den schadstoffbelasteten Pflanzen kam wahrscheinlich vordergründig durch die Ansäuerung des Vakuoleninhaltes zustande. Der Transport der Säurefracht in die Vakuolen würde, der aufgetretenen Streßsituation entsprechend, zur raschen Stabilisierung des cytoplasmatischen pH-Wertes beitragen, ohne daß eine Erhöhung der Pufferkapazität der Zellen erforderlich wäre.

Die Kurvenverläufe in Abbildung 37 liefern somit vor allem Aussagen darüber, welche pH-Bereiche mit welcher Intensität abgepuffert werden.

Die geringsten Pufferkapazitäten wurden bei beiden Baumarten im physiologisch relevanten pH-Bereich von 5,5 bis 7,5 festgestellt, während das Pufferungsvermögen der Blatt-Zellen insbesondere bei *Sorbus* oberhalb und unterhalb dieses Bereiches deutlich stärker ausgeprägt war. Eine Verschiebung des pH-Wertes in diese Regionen wird damit deutlich besser verhindert, als Schwankungen im physiologischen Bereich.

4.3.7 Elementgehalte der Blätter

Die Analyse des Pflanzenmaterials der OTC-Versuche erstreckte sich auch auf die Elementgehalte des der Blätter.

In der Tabelle 14 sind die Elementgehalte der getrockneten und pulverisierten Blattproben dargestellt. Die Angaben beschränken sich auf die Makronährstoffe N, P, S, K, Ca und Mg [vgl. BERGMANN, 1993].

Tabelle 14: Elementgehalte getrockneter Blätter der OTC-Pflanzen (in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TM}$). Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei Einzelmessungen an jeweils einer im Juli gewonnenen Mischprobe der in der ersten Spalte aufgelisteten Versuchsvarianten. Die Standardabweichung der Einzelwerte betrug in der Regel unter 1%.

	Element [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ TM}$]					
	N	P	S	K	Ca	Mg
Fagus - Kontrolle - 1996	23,50	1,63	1,90	6,25	11,05	1,79
Fagus - SO ₂ - 1996	23,15	1,65	2,95	5,11	11,32	1,94
Fagus - SO ₂ + O ₃ - 1996	22,12	1,64	2,47	5,81	11,3	1,81
Betula - Kontrolle - 1996	27,29	3,31	2,20	8,90	12,71	3,06
Betula - SO ₂ - 1996	23,38	3,28	2,81	10,15	10,14	2,95
Betula - SO ₂ + O ₃ - 1996	20,40	2,62	2,21	9,95	9,72	2,50
Betula - Kontrolle - 1997	19,39	3,38	2,43	9,57	12,44	2,77
Betula - SO ₂ – 1997	10,32	5,14	2,96	9,60	9,24	1,97
Betula - SO ₂ + O ₃ - 1997	21,67	3,00	2,25	10,67	7,37	2,04
Sorbus - Kontrolle - 1996	21,15	1,37	1,20	11,66	23,96	3,86
Sorbus - SO ₂ – 1996	25,71	1,39	1,55	8,91	18,55	3,40
Sorbus - SO ₂ + O ₃ - 1996	22,30	1,89	1,60	11,7	19,80	3,63
Sorbus - Kontrolle - 1997	28,33	1,76	1,36	9,77	27,27	2,73
Sorbus - SO ₂ – 1997	13,19	4,20	1,67	13,36	17,59	2,07
Sorbus - SO ₂ + O ₃ - 1997	18,11	4,03	1,32	16,21	17,10	2,63

Die Elementgehalte von Blättern sind nicht nur vom Gehalt und der Verfügbarkeit der Elemente im Boden und von Umweltfaktoren wie z.B. Licht, Feuchtigkeit und Temperatur abhängig, sondern auch von „pflanzeigenen Faktoren“ wie dem Nährstoffaneignungs- und Translokationsvermögen, das einerseits genetisch bedingt ist, aber auch vom Entwicklungszustand der jeweiligen Pflanze bestimmt wird [BERGMANN, 1993].

Aufgrund der Versuchsanordnung im OTC-Versuch war davon auszugehen, daß alle genannten Faktoren bei den drei Versuchsgruppen grundsätzlich weitestgehend ähnlich waren, so daß die festgestellten Veränderungen der Elementgehalte der Blätter mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die entstandene Streßsituation unter dem Einfluß der Begasung zurückzuführen sind.

Im Zusammenhang mit der Begasung erscheinen zunächst besonders die Schwefelgehalte der Blätter interessant. Die drei Baumarten wiesen dabei insbesondere bei den nur mit SO₂ begasten Pflanzen deutlich erhöhte Werte auf. Die S-Gehalte lagen hier um 22 bis 55% über denen der Kontrollen. Die S-Akkumulation in den Blättern war dabei bei *Fagus* besonders intensiv (+55%). *Betula* und *Sorbus* lagen etwa auf gleichem Niveau bei +22 bis +28%.

Weniger eindeutige Aussagen lassen sich darüber bei den mit der Schadstoffkombination behandelten Pflanzen treffen. Hier lagen die Schwefel-Werte nur teilweise über denen der Kontrollen. Bei *Betula* wurden bei dieser Variante sogar lediglich gleiche, bzw. leicht verringerte S-Gehalte gemessen. Bei Buchenblättern war dagegen der S-Gehalt der SO₂+O₃-Variante verglichen mit der Kontrolle um rund 30% erhöht. Die Schwefelgehalte der begasten Buchenblätter lagen damit im Bereich von Werten, die bei einer Freilanduntersuchung im Erzgebirge auf verhältnismäßig stark belasteten Flächen an Buchen gemessen wurden [PFANZ und VOLLRATH, 1993].

Bei *Sorbus* wurde in der ersten Probenahmeperiode eine erhöhte Schwefelkonzentration in den mit SO₂ und O₃ behandelten Blättern ermittelt (33% über dem Kontroll-Wert), während in der zweiten Probenahmeperiode ein dem Kontroll-Wert vergleichbarer Wert gemessen wurde.

Diesen Ergebnissen zufolge gab es bei Begasung der Pflanzen mit SO₂ allein einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten SO₂-Gehalt der Luft und dem S-Gehalt der Blätter, während dies bei der Behandlung der Pflanzen mit der Schadstoffkombination nicht der Fall war.

Die Ergebnisse legen die Schlußfolgerung nahe, daß das beiden schadstoffbelasteten Varianten in gleicher Konzentration zugeführte SO₂ von den Pflanzen möglicherweise mit unterschiedlicher Intensität über die Blätter aufgenommen wurde, oder in unterschiedlichem Maße in den Blättern abgelagert, bzw. aus diesen abgeleitet wurde.

ELKIEY und ORMROD [1981] beobachteten diesen Zusammenhang an Petunien, bei denen sie eine höhere Schadstoffaufnahme bei Applikation von Schwefeldioxid oder Ozon allein, als unter Belastung mit Mischungen aus beiden Schadstoffen feststellten.

Eine verminderte Schwefelaufnahme war in der vorliegenden Studie möglicherweise durch eine Verringerung der Spaltöffnungsweite bedingt, die unter gleichzeitiger Einwirkung von SO₂ und Ozon stärker auftrat als unter alleiniger Begasung mit SO₂. Hinweise darauf wurden bei der Infiltration der Blätter zur Bestimmung des Interzellularraumvolumens und zur Gewinnung der IWF gefunden (vgl. Kap. 4.3.3). Eine Ursache für diesen verstärkten Spaltöffnungsschluß könnte im Zusammenspiel der Photosynthese-Hemmung und Veränderungen des Zell-Wasserpotentials begründet liegen. Eine Hemmung der Photosynthese, beispielsweise über Blockade der CO₂-Bindungsstelle der Ribulosebiphosphat-Carboxylase durch SO₂, kann einen Spaltöffnungsverschluß über den CO₂-Regelkreis bewirken [LARCHER, 1994], während die unter Einwirkung von Ozon erhöhte Permeabilität von Membranen einen Austritt osmotisch wirksamer Substanzen aus den Zellen und damit auch einen Austritt von Wasser aus den Zellen zur Folge haben kann [GUDERIAN et al., 1985]. Dies bewirkt ebenfalls eine Verringerung der Spaltöffnungsweite. Obwohl berücksichtigt werden muß, daß SO₂ verhältnismäßig gut durch die Cuticula der Blätter permeieren kann, gelangt dieser Schadstoff dennoch hauptsächlich über die Stomata in die Blätter, so daß eine geringere Spaltöffnungsweite unter Einwirkung der Schadstoffkombination die SO₂-Aufnahme vermindern kann.

Der Magnesiumgehalt war bei den immissionsbelasteten Buchenblättern im Vergleich zu den Kontrollen nicht vermindert, während bei den beiden anderen Baumarten eine zum Teil deutliche Verringerung festgestellt wurde (z.B. *Betula* SO₂-Variante 1997, *Sorbus* SO₂-Variante 1997). Die Magnesiumgehalte der SO₂-Varianten lagen dabei mit einer Ausnahme (*Betula*, erste Probenahmeperiode) unter denen der SO₂+O₃-Varianten. Die schadstoffbelasteten Birken waren dabei in der zweiten Probenahmeperiode offensichtlich stärker von einer Magnesiumverarmung der Blätter betroffen, als im Jahr zuvor. Bei *Sorbus*

wurden in der zweiten Probenahmeperiode insgesamt geringere Magnesiumgehalte gemessen, im Verhältnis zu den Kontrollen wurden jedoch lediglich bei der SO₂-Variante geringere Mg-Gehalte als im Vorjahr festgestellt (1996: SO₂ 88% von K, 1997: SO₂ 76% von K).

Nach Angaben von BERGMANN [1993] sind Magnesiumgehalte von 1,5 bis 3,0 mg / g Blatt-Trockenmasse bei Buche und Birke als ausreichend anzusehen. (Für Eberesche liegen hier keine Angaben vor, da aber für alle bei BERGMANN aufgeführten Laubbaumarten ähnliche Bereiche angegeben sind, ist davon auszugehen, daß dies auch auf *Sorbus* zutrifft). Diesen Angaben zufolge lag bei keiner der Baumarten im OTC-Versuch Magnesiummangel in den Blättern vor.

Im Gegensatz zu den Freilandverhältnissen, bei denen eine Verarmung der Böden an Magnesium durch saure Schadstoffeinträge eine Unterversorgung der Pflanzen bedingen kann, war dies im Rahmen des OTC-Versuches aufgrund der Art der Bewässerung, der Flüssigdüngung im Frühjahr 1997 und der trockenen Schadstoffdeposition nicht zu erwarten. Ein Hauptfaktor verminderter Magnesiumgehalte der Blätter unter Immissionsbelastung trat hierdurch in den Hintergrund. Der Chlorophyllabbau bedingte daher vermutlich bei *Betula* und *Sorbus* die niedrigeren Magnesiumgehalte der begasten Blätter, bewirkte aber keinen drastischen Abfall der Werte bis zur Unterschreitung der Mangel-Grenze, da Magnesium nicht nur im Chlorophyllmolekül enthalten ist, sondern ebenfalls gelöst oder sorbiert vorkommen kann und auch Bestandteil anderer Moleküle wie Enzyme (z.B. Ribulosebiphosphat-Carboxylase) oder Pektate ist [LARCHER, 1994; HELDT, 1996]. Bei *Fagus* bewirkte die Schadstoffbelastung zwar ebenfalls einen deutlichen Pigmentabbau, möglicherweise wurde in diesem Falle aber das freiwerdende Magnesium an anderer Stelle gebunden oder nicht aus den Blättern abgezogen.

Die Calciumgehalte der Blätter waren bei den immissionsbelasteten Birken und Ebereschen deutlich niedriger, als bei den entsprechenden Kontrollpflanzen. Es wurden bei beiden Baumarten um 20-40% geringere Calciumkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollen gemessen. Zwischen den beiden Immissionsstreß-Varianten wurden keine deutlichen Unterschiede festgestellt. Auch in Bezug auf den Calciumgehalt zeigte sich das konträre Verhalten der Buchen. Die schadstoffbelasteten Pflanzen wiesen keinerlei Calciumverarmung der Blätter auf.

Nach BERGMANN [1993] erfolgt der Transport von Calcium nahezu ausschließlich passiv im Xylem. Ein Rücktransport von Ca²⁺ aus den Blättern in die Sproßachse oder in die Wurzel ist nur in ausgesprochen geringem Umfang möglich. Die Konzentration freien Calciums in der Pflanze ist aufgrund seiner Wirkung als Botenstoff streng reguliert und niedrig. Eine Remobilisierung gebundener Ca²⁺-Ionen findet praktisch nicht statt, so daß zur Aufrechterhaltung der Stoffwechsel- und Wachstumsvorgänge ständig Calcium von der Pflanze aufgenommen und transportiert werden muß. Die Aufnahme von Calcium aus dem Boden ist in erster Linie von dessen pH-Wert und der Ca-Verfügbarkeit abhängig. Letztere wird durch die Konzentration des Calciums selbst und die anderer Kationen wie z.B. Na⁺, K⁺, Mg²⁺ oder Al³⁺ bestimmt. Der Transport von Calcium zu den Blättern hängt maßgeblich vom Transpirationsstrom und damit von der Boden- und Luftfeuchtigkeit und der Spaltöffnungsweite ab.

Da die äußeren Faktoren für die Pflanzen aller drei Varianten gleich waren, müssen die Unterschiede im Ca-Gehalt der Blätter vermutlich durch pflanzeninterne Faktoren beeinflusst gewesen sein. Ein reduzierter Transpirationsstrom aufgrund verringerter Spaltöffnungsweite wäre ein denkbarer Mechanismus, allerdings stehen die Ca-Gehalte der Buchenblätter dieser These entgegen, da die begasten Blätter auch bei dieser Baumart Anzeichen einer verringerten

Spaltöffnungsweite zeigten. Nach BERGMANN [1993] kann allerdings das Aufnahme- und Translokationsvermögen für Calcium bei verschiedenen Pflanzenarten sehr unterschiedlich sein.

Auch der Entwicklungszustand der Blätter kann entscheidenden Einfluß auf deren Calciumgehalt haben. WAUGHMAN und BELLAMY [1981] konnten beispielsweise bei verschiedenen Spezies eine drastische Verschiebung des Calciumgehaltes der Blätter im Verlauf des Seneszenzprozesses nachweisen. Bei *Fagus sylvatica* wurde von diesen Autoren beim Vergleich zwischen lebenden und abgestorbenen Blättern eine Zunahme des Ca-Gehaltes um 48% festgestellt. Bei den schadstoffbelasteten Blättern der Buchen im OTC-Versuch, deren beschleunigte Seneszenz bereits im Hochsommer erkennbar war (vgl. Kap. 4.3.1), könnten die erhöhten Ca-Gehalte demzufolge durch die physiologische Umstellung der Pflanzen hin zu Blattseneszenz und -abscission bedingt gewesen sein.

Weitere Möglichkeiten die den geringeren Ca-Gehalt der Birken- und Ebereschenblätter erklären können, bestehen in einem geringeren Ca-Bedarf aufgrund geringerer Stoffwechselaktivität, oder in einer Wechselwirkung mit anderen Kationen wie z.B. K^+ [BERGMANN, 1993], dessen Konzentration in vielen Fällen bei den immissionsbelasteten Birken und Ebereschen leicht zunahm, während sie bei den begasten Buchenblättern abnahm. Kalium besitzt im Gegensatz zu Calcium eine hohe Mobilität in Xylem und Phloem und wird bevorzugt an Orten hoher Stoffwechselaktivität angereichert. Es erfüllt wichtige Funktionen als Osmotikum, bei der Enzymaktivierung und beim Aufbau elektrochemischer Gradienten (Membranpotential) [BERGMANN, 1993; LARCHER, 1994]. Die Kaliumgehalte der Blätter lagen an der unteren Grenze der bei BERGMANN [1993] mit 1-1,5% der Trockenmasse als ausreichend angegebenen Gehalte (Angaben für *Betula* und *Fagus*). Bei Buche lagen sie bereits im Mangelbereich. Die Gehalte der begasten Birken und Ebereschen waren, wie bereits erwähnt, in vielen Fällen höher als bei den Kontrollen, während die K-Gehalte der Buchen unter Luftschadstoffeinfluß unter demjenigen der Kontrolle lagen.

Der insgesamt geringe Kaliumgehalt der Buchenblätter ist möglicherweise auf ein artspezifisch geringeres K-Aneignungs- oder K-Translokationsvermögen in dem verwendeten skelettreichen, relativ humusarmen Substrat (vgl. Kap. 3.1.1.1) zurückzuführen, da sowohl *Betula* als auch *Sorbus* ein wesentlich stärkeres Wachstum als die Buchen zeigten, aber insgesamt höhere Kaliumgehalte aufwiesen, die weitestgehend außerhalb des Mangelbereiches lagen.

Möglicherweise zeigten sich bei *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* hinsichtlich der Elementaufnahme aus dem Boden charakteristische Eigenschaften von Pionierbaumarten, die ein rasches Wachstum auch auf armen Böden ermöglichen. Es darf jedoch auch nicht außer Acht gelassen werden, daß die Buchen unter einem Befall mit *Phyllaphis fagi* litten, der sich vermutlich nicht unerheblich auf den Elementgehalt (insbesondere bei phloemmobilen Elementen) auswirkte. Die gefundenen Unterschiede zwischen den schadstoffbelasteten Buchenblättern und den Kontrollen standen zudem möglicherweise ebenfalls mit den bereits oben diskutierten Stoffwechselumstellungen während des Seneszenzprozesses im Zusammenhang, da diese bei *Fagus* auch mit einem sinkenden Kaliumgehalt der Blätter verbunden sind [WAUGHMAN und BELLAMY, 1981].

Der Stickstoffgehalt der Blätter sollte nach Angaben von BERGMANN [1993] bei Buchen 1,9-2,5% und bei Birken 2,5-4% der Trockenmasse betragen, um ausreichend zu sein. Die Blätter der OTC-Pflanzen hatten teilweise etwas geringere Gehalte. Es waren jedoch bei den Kontroll-Pflanzen visuell keinerlei Anzeichen von Stickstoffmangel (wie z.B. gleichmäßig, gelbgrüne Blattfarbe oder kleine, spärlichere Belaubung) erkennbar, so daß davon

ausgegangen werden kann, daß diese ausreichend mit Stickstoff versorgt waren. Es kann demzufolge auch angenommen werden, daß im Pflanzsubstrat kein N-Mangel vorlag, so daß Unterschiede im N-Gehalt der Blätter vermutlich auf Veränderungen im Aufnahme- und Transportverhalten der Pflanzen zurückgingen. Allerdings zeigten die Untersuchungen zum N-Gehalt der Blätter auch keine eindeutigen Tendenzen auf. Beim Vergleich mit den jeweiligen Kontrollen wurden neben deutlich herabgesetzten N-Gehalten, wie z.B. bei der SO₂-Variante von *Betula* 1997, oder bei den beiden schadstoffbelasteten Gruppen von *Sorbus* 1997, auch erhöhte, oder den Werten der Kontrollen ähnliche Gehalte festgestellt (z.B. bei *Sorbus* - SO₂ 1997, oder *Fagus* – SO₂ 1996).

Ähnliche Aussagen müssen hinsichtlich des P-Gehaltes der Pflanzen getroffen werden. Auch hier waren die erhaltenen Resultate heterogen. In mehreren Fällen wurden deutlich erhöhte P-Gehalte bei den begasten Pflanzen festgestellt (z.B. *Betula* - SO₂ 1997, oder *Sorbus* - SO₂ und - SO₂+Ozon 1997), während bei den meisten anderen Proben den Kontrollen ähnliche Werte gemessen wurden. Interessant erscheint allerdings, daß die höchsten P-Gehalte bei denjenigen Proben festgestellt wurden, die die geringsten N-Gehalte hatten.

Insgesamt bleibt festzuhalten, daß die Begasung der Pflanzen hinsichtlich der Nährstoffgehalte der Blätter offenbar zu Imbalancen geführt hat. Welche Veränderungen in den Pflanzen hierfür letztendlich ausschlaggebend waren, muß Gegenstand weiterführender Untersuchungen an chronisch mit Luftschadstoffen belasteten Pflanzen sein.

4.3.8 Zusammenfassung

Die drei im Rahmen des OTC-Versuches untersuchten Laubbaumarten reagierten deutlich auf die Belastung mit SO₂ bzw. einer Kombination aus SO₂ und Ozon.

Zu den makroskopisch erkennbaren Schädigungssymptomen gehörten Chlorosen, Nekrosen und verfrühte Seneszenz. Die Ausbildung von Nekrosen wurde bei *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* insbesondere bei Belastung mit der Schadgaskombination festgestellt.

Die Blattflächen waren verringert.

Das Interzellularraum-Volumen war insbesondere bei Belastung der Pflanzen mit der Schadgaskombination vermindert.

Die Pflanzen zeigten einen geringeren Höhenzuwachs und eine geringere Zunahme der oberirdischen Biomasse. Auch diese Effekte waren unter Belastung mit SO₂ und Ozon deutlicher ausgeprägt als unter alleiniger Begasung mit SO₂.

In der zweiten Probenahmeperiode wurde im Frühjahr ein etwa um eine Woche verzögerter Austrieb der Knospen beobachtet.

Die Chlorophyllgehalte der begasten Blätter waren deutlich geringer als diejenigen der Kontrollen. Das Ausgangsniveau der Pigmentgehalte war am Beginn der ersten Probenahmeperiode bei *Betula* und *Fagus* dem der Kontrollen zunächst ähnlich und sank erst im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode ab, während die Chlorophyllgehalte im darauffolgenden Jahr bei *Betula* bereits Anfang Juni deutlich unter den Kontroll-Werten lagen. Hier muß von einem „Memory-Effekt“ ausgegangen werden. Bei *Sorbus* wurden dagegen von Beginn an bei den mit Luftschadstoffen belasteten Pflanzen deutlich niedrigere

Chlorophyllgehalte festgestellt. Der Pigmentverlust war bei *Betula* und *Fagus* unter Belastung mit der Schadstoffkombination stärker, als unter Einwirkung von SO₂ allein. Bei *Sorbus* wurde dies nicht festgestellt, hier fanden sich eher Anzeichen einer stärkeren Wirkung der alleinigen Begasung mit SO₂.

Die Untersuchungen der Elementgehalte der Blätter zeigten bei allen Baumarten unter Schadstoffbelastung Imbalancen im Gehalt an Makronährstoffen auf.

Charakteristisch war ein deutlich erhöhter Schwefelgehalt der SO₂-Varianten (+22 bis +55%), während bei den SO₂+O₃-Varianten, trotz Belastung der Pflanzen mit der gleichen SO₂-Konzentration keine derartig eindeutige Tendenz erkennbar war. Möglicherweise standen die Ergebnisse mit einer stärkeren Verringerung der Spaltöffnungsweite unter Begasung mit dem Gemisch aus SO₂ und Ozon in Zusammenhang.

Hinsichtlich der Magnesium, Calcium und Kaliumgehalte traten vor allem deutliche Unterschiede zwischen den beiden Pionierbaumarten und der Klimax-Baumart *Fagus sylvatica* auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß sich die unterschiedliche ökologische Stellung der Baumarten in unterschiedlichen Strategien bei Nährstoffaufnahme, -transport und -speicherung niederschlägt.

4.3.9 Peroxidaseaktivität

Eines der wesentlichen Anliegen der vorgestellten Studie war es, die drei Laubbaum-Arten unter verschiedenen abiotischen und biotischen Streßsituationen im Hinblick auf die Reaktion ihrer apoplastischen Peroxidasen zu untersuchen. Es sollte überprüft werden, ob und in welchem Maße sich der applizierte Streß auf die IAA- und Sulfitoxidations-Aktivität der Zellwand-Peroxidasen auswirkte. Damit wurde einerseits die Beteiligung der Peroxidasen am Abbau eines Wachstum und Entwicklung regulierenden Phytohormones und andererseits eine potentielle Entgiftungsreaktion für die Folgeprodukte des Schwefeldioxids untersucht.

Die Peroxidaseaktivität wurde, wie in den Kapiteln 3.6.1 und 3.6.2 beschrieben, als Sauerstoffzehrung bei der Umsetzung von Sulfit zu Sulfat und bei der Oxidation von IAA zu Indol-3-aldehyd bzw. zu 3-Methylenoxindol *in vitro* mit Hilfe von Sauerstoffelektroden gemessen. Durch Erstellung von Umsatz-Volumen-Kurven war es möglich, den Bereich der linearen Abhängigkeit der Umsatzrate vom eingesetzten IWF-Volumen zu ermitteln und dadurch die Messungen für die verschiedenen Baumarten und Behandlungsvarianten unter optimierten Bedingungen vergleichbar zu machen.

4.3.9.1 Jahreslauf der Enzymaktivität

Bei allen drei Baumarten im Immissionsstreß-Versuch wurde eine jahreszeitliche Dynamik der Peroxidaseaktivität im Apoplasten festgestellt.

Anhand der ausführlichen Untersuchungen zum Jahreslauf der Enzymaktivität an der als Vergleich beprobten 30 bis 40 jährigen Buche (vgl. Kap. 3.1.3) konnte diese enge Beziehung zwischen dem Probenahmeterrmin und der gemessenen Enzymaktivität bestätigt werden. Demnach steigt die Peroxidaseaktivität im Verlauf des Sommers an, erreicht zu Beginn des Herbstes ein Maximum und fällt danach in der Phase der Blattabszission rasch ab. In der

Abbildung 38 ist der zeitliche Verlauf der IAA- und Sulfitoxidations-Aktivität bei diesem Baum beispielhaft für die Vegetationsperiode 1997 dargestellt.

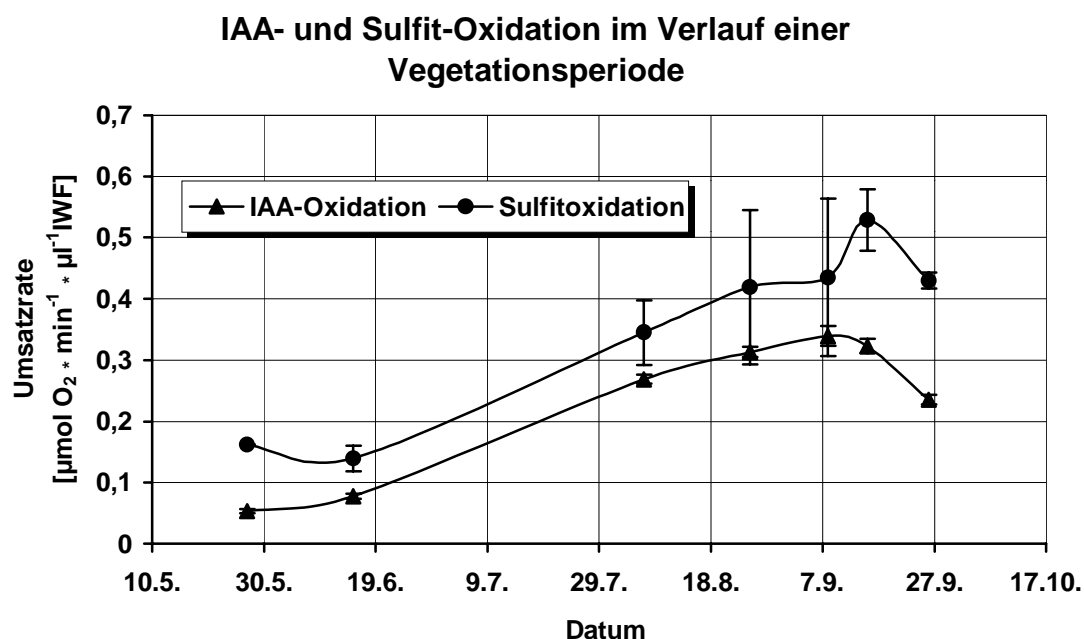


Abbildung 38: Sulfit- und IAA-Oxidationsraten apoplastischer Peroxidasen aus den Blättern eines Altbaumes der Baumart *Fagus sylvatica* im Verlauf der Vegetationsperiode 1997

Diese bei allen drei Baumarten zwar unterschiedlich stark ausgeprägte, aber dennoch überall erkennbare, Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Zeitpunkt der Probenahme im Verlauf der Vegetationsperiode muß bei der folgenden Diskussion der Schadstoffproblematik berücksichtigt werden.

4.3.9.2 Sulfitoxidation

Die Vermutung, daß die Versuchspflanzen auf die Schadstoffexposition mit einer Steigerung der Aktivität extrazellulärer, sulfitoxidierender Peroxidasen, bzw. mit einer vermehrten Ausschüttung dieser Enzyme in den Apoplasten reagieren, ließ sich anhand der in der IWF gemessenen Enzymaktivitäten nur eingeschränkt bzw. nicht bestätigen. Die folgenden Ergebnisdarstellungen sollen dies verdeutlichen.

Die Sulfitoxidations-Aktivitäten in den IWF-Proben von *Fagus sylvatica* waren am Beginn der Probenahmeperiode 1996 zunächst bei allen Versuchsvarianten auf gleichem, niedrigem Niveau (Abbildung 39). Bei der zweiten und dritten Probenahme (nach 15 und 20 wöchiger Belastungsdauer) wurden demgegenüber deutlich höhere Umsatzraten bei den schadstoffbelasteten Pflanzen als bei den Kontrollen gemessen. Bei der Ende Juli durchgeführten Probenahme wurden sogar um 100% über den Kontroll-Werten liegende Sulfitoxidationsraten ermittelt. Die statistische Auswertung mit Hilfe des U-Tests ergab für diesen Probenahmezeitpunkt eine hohe Signifikanz der Unterschiede zur Kontrolle (in beiden Fällen $p = 0,008$). Bei der darauffolgenden Probenahme war nur der Unterschied zwischen den Kontrollen und den mit SO₂ belasteten Pflanzen signifikant ($p = 0,04$). Die nach 24

Wochen Belastung im Herbst gewonnenen Proben wiesen dagegen eine verminderte Sulfitoxidations-Aktivität im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle auf, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

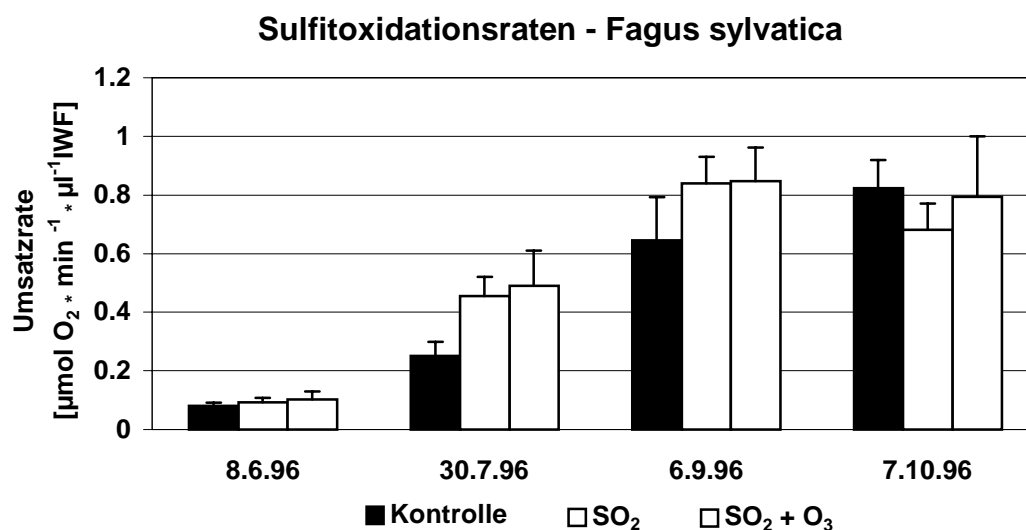


Abbildung 39: Umsatzraten Sulfit oxidierender, apoplastischer Peroxidasen von *Fagus sylvatica* unter Immissionsbelastung

Die Peroxidaseaktivitäten der beiden Immissionsstreß-Varianten unterschieden sich, abgesehen von der Probenahme im Oktober, nicht voneinander. Bei dieser Probenahme muß jedoch die verhältnismäßig große Standardabweichung der SO₂+O₃-Werte berücksichtigt werden. Die statistische Auswertung ergab daher zu keinem Probenahmezeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden belasteten Gruppen.

Eine Erklärung für die niedrigeren Oktober-Werte bei den beiden Schadgas-Varianten könnte der schlechtere Vitalitätszustand und die damit verbundene frühere Seneszenz der Blätter dieser Pflanzen im Verhältnis zu den Kontrollpflanzen liefern (vgl. Kap. 4.3.1).

In diesem Zusammenhang muß diskutiert werden, ob eine beschleunigte Seneszenz der schadstoffbelasteten Blätter möglicherweise generell für die beobachteten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Schadstoff-Varianten verantwortlich zu machen ist. Sofern die bei der Blattalterung ablaufenden Prozesse den in Abbildung 38 dargestellten Verlauf der Peroxidaseaktivität vordergründig bestimmen, verschiebt sich die erhaltene Kurve bei beschleunigter Seneszenz nach vorn. Der Zeitpunkt der höchsten Aktivität, und somit auch derjenige des Abfallens der Umsatzraten im Herbst, würde damit früher in der Vegetationsperiode eintreten. Im Hinblick auf die in Abbildung 39 dargestellten Verhältnisse würde dies bedeuten, daß unter Immissionsbelastung eine Verschiebung der zeitlichen Verläufe um etwa einen Monat nach vorn eingetreten war. Im Oktober war somit der Zeitpunkt der höchsten Aktivität bei den Schadstoff-Varianten bereits überschritten, während die Kontroll-Pflanzen vermutlich gerade maximale Enzymaktivität zeigten. Eine aktive Beteiligung der Peroxidasen an der Streßabwehr würde damit allerdings als Auslöser für deren gesteigerte Aktivität im Apoplasten in den Hintergrund treten. Für diese These spricht nicht nur die Parallelität des zeitlichen Verlaufs der Enzymaktivität der Kontrollen zu den Verläufen der Schadstoff-Varianten, sondern hierfür sprechen auch die gemessenen

Umsatzraten selbst, die bei Subtraktion der zeitlichen Verschiebung etwa auf gleichem Niveau liegen, bzw. sogar ein höheres Umsatzpotential der Kontrollen aufzeigen.

Inwieweit der Befall der Blätter mit *Phyllaphis fagi* zur Entstehung der vorliegenden Ergebnisse beigetragen hat, läßt sich nur schwer beurteilen.

Wie Resultate des 1997 mit Buchen-Jungpflanzen durchgeführten Zusatzversuches zeigten, kann allein durch den Befall mit *Phyllaphis fagi* bereits nach wenigen Wochen eine Steigerung der Peroxidaseaktivität induziert werden (vgl. Kap. 4.4.2). Da aber im OTC-Versuch sowohl die Schadgas-Varianten als auch die Kontrollen vom Blattlausbefall betroffen waren, könnten die gemessenen Aktivitäten dennoch zumindest aus einer Kombinationswirkung der biotischen und abiotischen Streßfaktoren resultieren.

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmung in der IWF der beiden anderen Baumarten zeigten beim Vergleich der Behandlungsvarianten ein inhomogeneres Bild. Anhand der Ergebnisse aus beiden Vegetationsperioden lassen sich jedoch mehrere Aussagen ableiten.

Bei *Betula pendula* lagen die gemessenen Sulfitoxidations-Raten der Kontrollpflanzen in den meisten Fällen über denen der mit SO_2 belasteten Pflanzen. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war im ersten Jahr der Probenahmen mit Ausnahme der Oktober-Proben signifikant, im zweiten Jahr ergab die statistische Auswertung der Daten keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 15). Die Peroxidase-Umsatzraten der mit der Schadstoffkombination behandelten Pflanzen zeigten dagegen, ausgehend von einem relativ niedrigen Niveau am Beginn der Vegetationsperiode, in der zweiten Hälfte beider Vegetationsperioden einen starken Anstieg, so daß sie zwischen 20 und 40% höhere Raten als die beiden anderen Varianten erreichten (Abbildung 40). Die Unterschiede zwischen der Kontroll-Gruppe und der SO_2 -Ozon-Gruppe waren mit Ausnahme der Probenahme im Juni des ersten Jahres zu jedem Probenahmezeitpunkt signifikant. Die Unterschiede zwischen den beiden schadstoffbelasteten Gruppen erwiesen sich gleichfalls als signifikant (vgl. Tabelle 15).

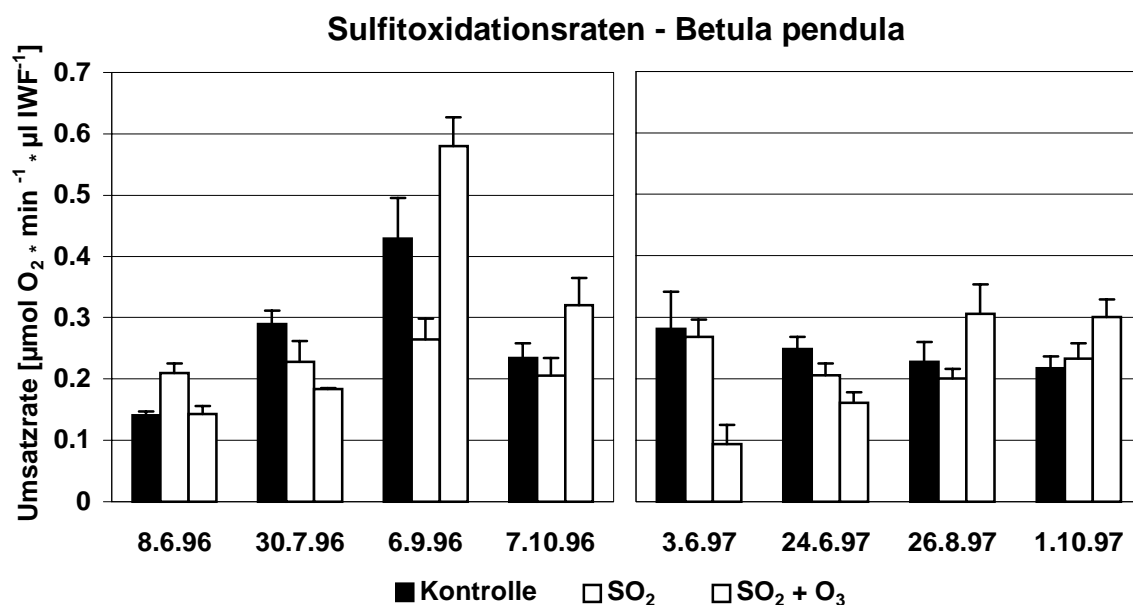


Abbildung 40: Sulfitoxidationsraten apoplastischer Peroxidasen von *Betula pendula* unter Immissionsbelastung im Verlauf zweier Vegetationsperioden

Tabelle 15: Signifikanz der Unterschiede der Sulfitoxidations-Aktivitäten zwischen den Versuchsgruppen bei *Betula pendula* berechnet mit Hilfe des U-Tests nach MANN und WHITNEY [1947] und dargestellt als Irrtumswahrscheinlichkeit p. Bei signifikanten Unterschieden ($p \leq 0,05$) wurden die Tabellenfelder grau hinterlegt.

	Irrtumswahrscheinlichkeit p		
Datum der Probenahme	Kontrolle – SO ₂	Kontrolle – SO ₂ +O ₃	SO ₂ – SO ₂ +O ₃
08.06.96	0,050	0,513	0,050
30.07.96	0,021	0,034	0,034
06.09.96	0,021	0,021	0,021
07.10.96	0,111	0,021	0,014
03.06.97	0,773	0,021	0,021
24.06.97	0,083	0,021	0,021
26.08.97	0,060	0,002	0,001
01.10.97	0,172	0,001	0,001

Die Einwirkung von Ozon bzw. ein Zusammenspiel der beiden applizierten Luftschadstoffe hatte demnach einen stimulierenden Effekt auf die apoplastischen Peroxidasen, während eine Belastung mit SO₂ eher in geringem Maße hemmend wirkte.

Gleichzeitig zeigen diese Ergebnisse aber auch, daß die Peroxidasen des Apoplasten bei dieser Baumart wahrscheinlich nicht in einen raschen Abwehrprozeß bei Belastung durch Luftschadstoffe integriert sind. Das im Verlauf der Vegetationsperiode verhältnismäßig späte Ansteigen der Peroxidase-Umsatzraten hätte nur noch geringfügig zur Schadstoffentlastung der Blätter beigetragen, da die Blätter schon viele Wochen (hier 17 bzw. 21 Wochen) der Begasung ausgesetzt waren und der Alterungsprozeß teilweise bereits begonnen hatte. Es ist daher anzunehmen, daß nicht die Sulfitoxidation, sondern andere natürliche Funktionen der *in vitro* sulfitoxidierenden Peroxidasen im Vordergrund standen und zu einer Aktivitätssteigerung führten. Die chronische Schadstoffbelastung der Pflanzen kann in diesem Falle, möglicherweise nach Ausschöpfung anderer Abwehrmechanismen, zu einer Intensivierung von Stoffwechselsequenzen, die unter Beteiligung von Peroxidasen ablaufen, beigetragen haben. Naheliegend wären beispielsweise eine verstärkte Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid als Folgeprodukt von oxidativem Streß [CASTILLO, 1992] oder Reaktionen, die zur Stabilisierung der Zellwand beitragen.

Nach bisherigen Erkenntnissen entsteht Wasserstoffperoxid als Folgeprodukt verschiedener Reaktionen von Ozon mit Komponenten der Zellwand [HEATH, 1980; HEATH und TAYLOR, 1997]. Zusätzlich soll H₂O₂ unter Ozoneinwirkung auch „endogen“ produziert werden [SCHRAUDNER et al., 1997]. Die Regulation der Wasserstoffperoxidkonzentration in der Zellwand stellt eine wichtige Funktion apoplastischer Peroxidasen dar. Der größte Teil der von diesen Enzymen katalysierten Reaktionen ist mit einem Verbrauch von Wasserstoffperoxid verbunden und trägt damit zur Entgiftung dieses reaktiven Moleküls bei.

Im Bereich des intrazellulären antioxidativen Systems spielen Peroxidasen als Wasserstoffperoxid entgiftende Enzyme insbesondere in Form von Ascorbat-Peroxidasen eine wichtige Rolle. Viele Untersuchungen weisen auch auf das Vorhandensein eines ascorbatabhängigen Entgiftungssystems im Apoplasten hin. In der Zellwand verschiedener Pflanzenarten, wie beispielsweise *Sedum album*, *Phaseolus vulgaris* oder *Cucurbita pepo* wurde Ascorbat-Peroxidase-Aktivität gefunden [CASTILLO, 1986; PETERS et al., 1988; RANIERI et al. 1996]. Eine simultane Sekretion von Ascorbat und Peroxidasen in den Apoplasten wird bereits seit längerem diskutiert [GASPAR et al., 1985], und es gibt Hinweise auf einen Anstieg der Ascorbat- und der Ascorbat-Peroxidase-Konzentration im Apoplasten unter dem Einfluß von Ozon [CASTILLO und GREPPIN, 1986; RANIERI et al., 1996]. Der Nachweis von Ascorbat-Peroxidasen scheint allerdings problematisch, da die Ascorbat-Peroxidase-Aktivität in der IWF offenbar nicht stabil bleibt. Für einen Erhalt dieser Aktivität in der IWF soll nach POLLE et al. [1990] und RANIERI et al. [1996]. ein Zusatz von Ascorbat zum Infiltrationsmedium unabdingbar sein. Es scheint demzufolge unwahrscheinlich, daß *in vivo* mit Ascorbat reagierende Peroxidasen im hier durchgeführten *in vitro* Test eine Sulfitoxidation in nennenswertem Maße katalysieren konnten.

Die Sulfitoxidation muß also von Peroxidasen mit anderen Substratspezifitäten katalysiert worden sein. Hierbei müssen vor allem die zellwandstabilisierenden Reaktionen dieser Enzyme diskutiert werden. Dazu gehören sowohl die Lignifizierung als auch die Vernetzung von Zellwandpolysacchariden und -proteinen.

Eine Induktion von Enzymen, die mit der Lignifizierung gekoppelt sind, wie z.B. Zimtalkohol-Dehydrogenase und Phenylalanin-Ammonium-Lyase wurde unter Streßeinwirkung (insbesondere Ozon, aber auch andere Stressoren) vielfach beobachtet [GALLIANO et al., 1993; SHARMA und DAVIS, 1994; LANGEBAEELS et al., 1997, PÄÄKKÖNEN et al., 1998]. Lignifizierung stellt jedoch durch die Verdrängung des Quellungswassers im Pektin-Gel und eine Inkrustation der interfibrillären Räume [WEISSENBÖCK, 1976] immer eine Abdichtung der Zellwand dar und ist für die betreffenden Zellen in der Regel mit dem Prozeß des Absterbens verbunden. Da die über die Spaltöffnungen der Blätter infiltrierte Lösung vordergründig mit den Zellwänden der Mesophyllzellen in Kontakt kam, würde die höhere Peroxidaseaktivität in diesem Falle bedeuten, daß die Zellwände der Mesophyllzellen stärker lignifiziert wurden. Eine Behinderung der natürlichen Funktion der Mesophyllzellen wäre als Folge zu erwarten. Zudem bedeutet Lignifizierung auch eine Investition von Stoffwechselleistungen in den Substanzaufbau. Dies erscheint bei Blättern, die bereits zu altern beginnen und wenige Wochen später abgeworfen werden, nicht effektiv.

Eine Abdichtung von Zellen, die mit Schadstoffen stark belastet sind, zum Schutz weniger belasteter Zellen oder zur Verhinderung der Verfrachtung dieser Schadstofflast in andere Pflanzenorgane wäre jedoch ein denkbarer Abwehrmechanismus.

Bei stichprobenartigen Überprüfungen des Lignifizierungsgrades der Gewebe mit Hilfe der Ligninfärbung durch Phloroglucin und Salzsäure konnten allerdings keine Ligninablagerungen im Mesophyll festgestellt werden. Möglicherweise induzierte aber eine Steigerung der Konzentration niedermolekularer Phenole und der Peroxide in der Zellwandphase dennoch einen Anstieg der Peroxidaseaktivität, der letztendlich auch in der isolierten IWF meßbar war.

Die Bildung von Diferulat-Brücken zwischen Zellwandpolysacchariden und die Verknüpfung von Proteinen der Zellwand oder der Plasmamembran sind ebenfalls H_2O_2 -verbrauchende, durch Peroxidasen katalysierte Reaktionen, die eine protektive Wirkung haben können (vgl. Kap. 1.4).

Auch durch die Folgeprodukte der Luftschadstoffe bzw. durch die Membranschädigung in Gang gesetzte Signalketten, die ähnlich den durch Elicitoren bei der Pathogen-Pflanze-Wechselwirkung induzierten Reaktionen ablaufen, sind als Ursache für den Anstieg der Peroxidaseaktivität denkbar. Ähnliche Konzepte wurden im Zusammenhang mit Ozonwirkungen bereits mehrfach diskutiert [SCHMIEDEN und WILD, 1995, SANDERMANN, 1996; SCHRAUDNER et al., 1997; SANDERMANN et al., 1990 und 1998]. Auch die Stimulation der Biosynthese von Stilbenen und Flavonoiden unter Ozoneinfluß [ROSEMAN et al., 1991] deutet auf einen derartigen Mechanismus hin. Beide Stoffgruppen werden häufig bei Befall der Pflanzen mit Pathogenen induziert.

Im Zusammenhang mit Membranschädigungen und pH-Wert-Veränderungen durch das Zusammenwirken von Ozon und SO₂ muß auch die Umverteilung von Ionen als physiologische Grundlage für eine erhöhte Enzymaktivität in der IWF diskutiert werden. Hierbei kommt, wie bereits erwähnt, vor allem den Ca²⁺-Ionen als Botenstoff eine zentrale Rolle zu (vgl. Kap. 4.2.3). Ein verstärkter Influx von Calciumionen in das Cytoplasma kann eine erhöhte Sekretion von Peroxidasen in den Apoplasten bewirken [GASPAR et al., 1985]. Diesen Zusammenhang konnten CASTILLO et al. [1984a] an ozonbegasten Blättern von *Sedum album* indirekt nachweisen und CASTILLO und HEATH [1990] zeigten, daß die Calciumpermeabilität von Membranen unter Ozoneinfluß erhöht war und sich der ATP-abhängige Abtransport des Calciums über die Zellmembran teilweise verschlechterte.

Einschränkend muß jedoch angemerkt werden, daß es sich bei den beschriebenen Effekten um kurz nach der Einwirkung von Ozon beobachtete Vorgänge handelte, so daß das späte Ansteigen der Peroxidaseaktivität in den Birken-Blättern damit nicht hinreichend erklärt werden kann.

Im Zusammenhang mit dem spätsommerlichen Anstieg der Peroxidaseaktivität bei den mit SO₂ und Ozon belasteten Pflanzen muß auch bei *Betula* die Integration dieser Enzyme in den Seneszenzvorgang diskutiert werden. Insgesamt ist *Betula pendula*, den vorliegenden Untersuchungen zufolge und ihrem Wuchstyp entsprechend, die Baumart mit der am geringsten ausgeprägten jahreszeitlichen Dynamik. Dennoch könnte die Begasung mit der Schadstoffkombination verstärkt Seneszenzprozesse bei den Pflanzen induziert haben, die mit einem Anstieg der Peroxidaseaktivität verbunden waren. Wie bereits in Kapitel 4.3.1 angesprochen, kann bei Birken über lange Zeiträume der Vegetationsperiode hinweg ein Neuaustrieb der Blätter erfolgen, so daß stark geschädigte Blätter bei ausreichend ernährten Pflanzen ohne hohe Verluste an der Gesamtblattmasse verfrüht abgeworfen werden können [vgl. MAURER und MATYSSEK, 1997 sowie MATYSSEK und INNES, 1999]. Dieser Streßbewältigungsmechanismus wurde bei den mit der Kombination aus SO₂ und Ozon begasten Birken beobachtet und könnte mit der erhöhten Enzymaktivität verknüpft gewesen sein. Dabei muß einerseits die wichtige Rolle der Peroxidasen beim Abbau von IAA betrachtet werden und andererseits auch die Verbindung zwischen der Ethylenkonzentration bzw. der Ethylenbiosynthese und den Peroxidasen.

IAA hemmt die Bildung von Trennungsgewebe bei Blättern [HELDT, 1996]. Der Abbau dieses Pflanzenhormons ist daher ein wichtiger Schritt zur Vorbereitung der Blattabszission und wahrscheinlich ist dies die Hauptfunktion von Peroxidasen im Seneszenzprozeß [KHAN und MALHOTRA, 1982]. Eine hohe IAA-Oxidase-Aktivität in den IWF-Proben, die auch hohe Sulfitoxidations-Aktivität zeigten, untermauert diese These. (Auf die gemessenen IAA-Oxidationsraten und den Vergleich zwischen den beiden unterschiedlichen Enzymaktivitäten wird im Kapitel 4.3.9.3 ausführlicher eingegangen.) Zugleich ist das Einsetzen der Seneszenz von einer Erhöhung der Ethylenproduktion der Pflanzen begleitet und eine Aktivierung von

Peroxidasen durch Ethylen scheint möglich zu sein. BOYER und DE JAEGER [1986] schlußfolgerten aus ihren Resultaten von Versuchen an *Bryonia dioica* eine Induktion saurer Peroxidasen durch Streß-Ethylen und auch GASPAR et al. [1985] hielten eine Korrelation zwischen der Ethylenkonzentration und der Aktivität saurer Zellwand-Peroxidasen für möglich.

Die Frage der Beteiligung von Peroxidasen an der Ethylenbiosynthese als Aminocyclopropan-Carboxylat-Oxidasen (ACC-Oxidasen), oder als Lieferanten von aktivierten Sauerstoffspezies ist mehrfach diskutiert worden, ohne jedoch bisher eine abschließende Antwort zu finden [z.B. GASPAR et al., 1985; BOYER und DE JAEGER, 1986; McDUGALL, 1992].

Als gesichert kann gelten, daß die Ethylenabgabe von Pflanzen unter dem Einfluß von Luftschadstoffen wie Ozon und SO₂ ansteigt [BUCHER, 1981; CASTILLO et al., 1987; HEATH und TAYLOR, 1997]. Die Begasung der Birken mit SO₂ und Ozon könnte demzufolge auch über die Signalwirkung des Ethylens sowohl einen verfrühten Seneszenzprozeß bei den stärker geschädigten Blättern als auch den Anstieg der Peroxidaseaktivität in der zweiten Hälfte der Vegetationsperiode induziert haben.

Die Untersuchungen an *Sorbus aucuparia* ergaben, daß, mit Ausnahme der Juni-Werte von 1996, die Sulfitoxidationsraten der Kontrollen deutlich höher lagen, als die der beiden anderen Versuchsgruppen (Abbildung 41). In nahezu allen Fällen war der Unterschied zwischen den Kontrollen und den schadstoffbelasteten Gruppen signifikant (vgl. Tabelle 16). Bei fünf von insgesamt sieben Probenahmen lagen die Sulfitoxidations-Raten der SO₂+O₃-Variante über denen der SO₂-Variante, es wurden aber nur in drei Fällen signifikant höhere Raten gemessen und Ende August 1997 waren zudem die Umsatzraten der SO₂-Variante deutlich höher als die der SO₂+O₃-Variante (vgl. Tabelle 16). Im Gegensatz zu *Betula* unterschieden sich also die Effekte der Schadgaskombination kaum von denjenigen des SO₂.

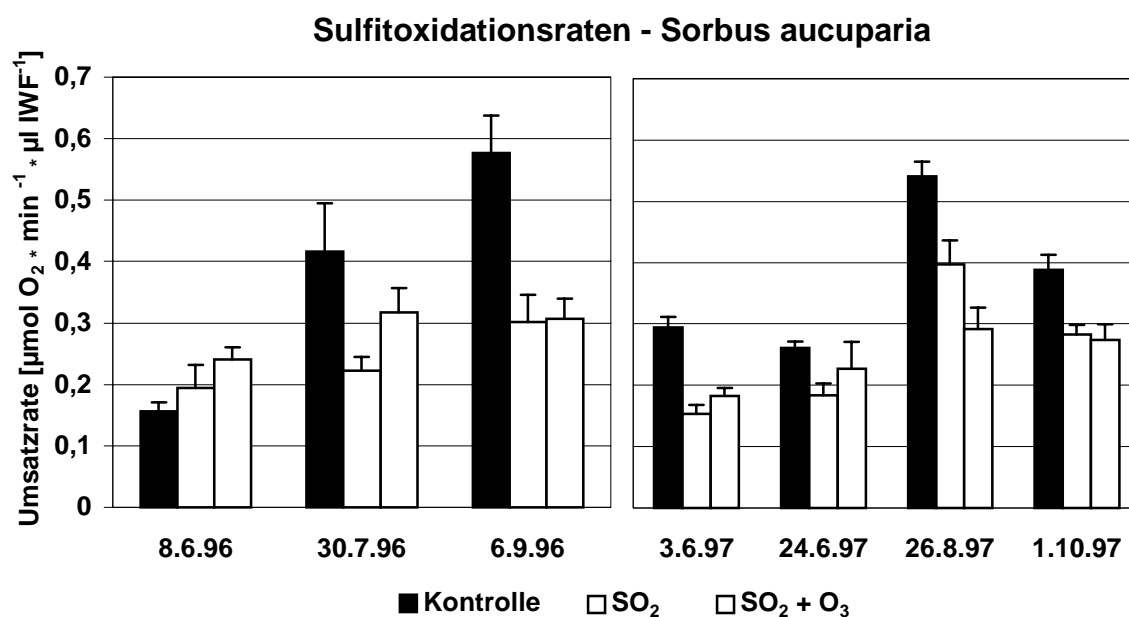


Abbildung 41: Sulfitoxidationsraten apoplastischer Peroxidasen von *Sorbus aucuparia* unter Immissionsbelastung im Verlauf zweier Vegetationsperioden

Tabelle 16: Signifikanz der Unterschiede der Sulfitoxidationsraten zwischen den Versuchsgruppen bei *Sorbus aucuparia* berechnet mit Hilfe des U-Tests nach MANN und WHITNEY [1947] und dargestellt als Irrtumswahrscheinlichkeit p. Bei signifikanten Unterschieden ($p \leq 0,05$) wurden die Tabellenfelder grau hinterlegt.

	Irrtumswahrscheinlichkeit p		
Datum der Probenahme	Kontrolle – SO ₂	Kontrolle – SO ₂ +O ₃	SO ₂ – SO ₂ +O ₃
08.06.96	0,248	0,021	0,043
30.07.96	0,021	0,043	0,021
06.09.96	0,021	0,021	0,773
03.06.97	0,021	0,021	0,043
24.06.97	0,021	0,248	0,149
26.08.97	0,001	0,001	0,001
01.10.97	0,001	0,001	0,294

Demzufolge verlief bei *Sorbus aucuparia* die Streßantwort vollkommen anders gerichtet als bei den beiden anderen Baumarten. Die Peroxidasen des Apoplasten waren offenbar unter diesen Bedingungen nicht in Mechanismen zur Streßbewältigung involviert. Die Streßreaktion bestand hier möglicherweise in einer verminderten Enzym-Neusynthese, bzw. in einem erhöhten Abbau der Enzymproteine in den Blättern. Die Ursache für das Verhalten der Ebereschen unter dem Einfluß der Luftschadstoffe könnte in der bereits visuell erkennbaren, stärkeren Schädigung der Pflanzen begründet gewesen sein (vgl. Kap. 4.3.1 und 4.3.4). Diese Schädigung könnte eine Reduzierung der Enzymaktivität im Apoplasten zur Folge gehabt haben. Möglicherweise war in den Kammerversuchen vor allem die Kontinuität der Begasung mit den Luftschadstoffen, ohne längere Erholungsphasen, ausschlaggebend für die gefundenen Resultate. Durch die chronische Belastung könnten kompensatorische und restabilisierende Mechanismen zur Streßbewältigung außer Kraft gesetzt worden sein.

Eine andere Erklärung für die geringe Peroxidaseaktivität unter dem Einfluß von Luftschadstoffen könnte das Vorhandensein von Peroxidaseinhibitoren im Apoplasten sein. Hierfür kommen phenolische Verbindungen wie z.B. Chlorogensäure, Kaffeesäure oder Isoflavone in Frage [LEGRAND et al., 1976; ROS BARCELÒ und MUÑOZ, 1992]. Eigene Untersuchungen deuten auf eine inhibitorische Wirkung von Sinapinsäure hin, die die Sulfitoxidation komplett hemmte, wenn sie dem *in vitro* Reaktionsansatz zugesetzt wurde.

Es ist denkbar, daß im Zusammenhang mit dem Angriff der Luftschadstoffe auf die Zellmembranen ein Signal zur Abgabe phenolischer Verbindungen in den Apoplasten ausgelöst wurde. Die Wechselwirkungen zwischen Peroxidasen und phenolischen Verbindungen sind außerordentlich vielfältig und reichen von der Vermittlung peroxidasekatalysierter Reaktionen als Cofaktoren über direkte Beteiligung an den Reaktionen als Substrate bis hin zu regulatorischen Funktionen als Inhibitoren. Eine genauere Untersuchung der phenolischen Substanzen im Apoplasten ist daher von großem Interesse.

4.3.9.3 IAA-Oxidation

Die 1997 durchgeführten Messungen zur IAA-Oxidation ergaben grundsätzlich ähnliche Tendenzen wie die Sulfitoxidations-Messungen.

Ebenso wie bei der Sulfitoxidation wurde bei *Betula pendula* im Verlauf der Vegetationsperiode eine deutliche Steigerung der Peroxidase-Umsatzraten der mit SO₂ und Ozon behandelten Pflanzen beobachtet. Lediglich am Beginn der Vegetationsperiode wurden im Unterschied zur Sulfitoxidation bei den mit SO₂ begasten Pflanzen etwas höhere Umsatzraten als bei den Kontrollen gemessen (Abbildung 42).

Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren zu allen Probenahmezeitpunkten signifikant (U-Test, $p < 0,05$). Die einzige Ausnahme bildete die SO₂-Gruppe der August-Probenahme. Die Umsatzraten lagen hier auf dem Niveau der Kontrollen.

Auch bei den Ebereschen zeigten sich im Jahresverlauf der IAA-Oxidationsaktivitäten ähnliche Tendenzen wie bei der Sulfitoxidation. Die Umsatzraten der Kontrollen lagen bei allen vier durchgeführten Probenahmen deutlich über den Raten der Schadgas-Varianten.

Die IAA-Oxidationsraten der beiden begasten Varianten waren in der ersten Hälfte der Vegetationsperiode nahezu gleich, während sie in der zweiten Hälfte bei der mit SO₂ und Ozon begasten Variante etwas höher waren (Abbildung 43). Aufgrund der geringen Standardabweichungen ergab die statistische Auswertung für alle verglichenen Gruppen (einschließlich des Vergleichs der beiden Schadgas-Varianten untereinander) und zu allen Zeitpunkten signifikante Unterschiede (U-Test, $p \leq 0,05$).

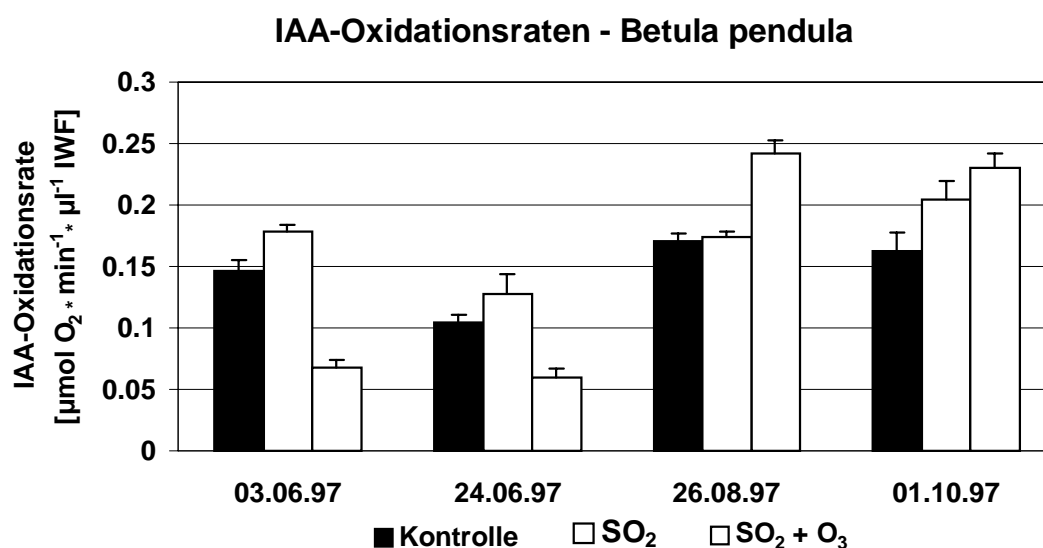


Abbildung 42: IAA-Oxidationsraten apoplastischer Peroxidasen von *Betula pendula* im Verlauf der Vegetationsperiode 1997 - Einfluß chronischer Belastung mit den Luftschadstoffen SO₂ und Ozon.

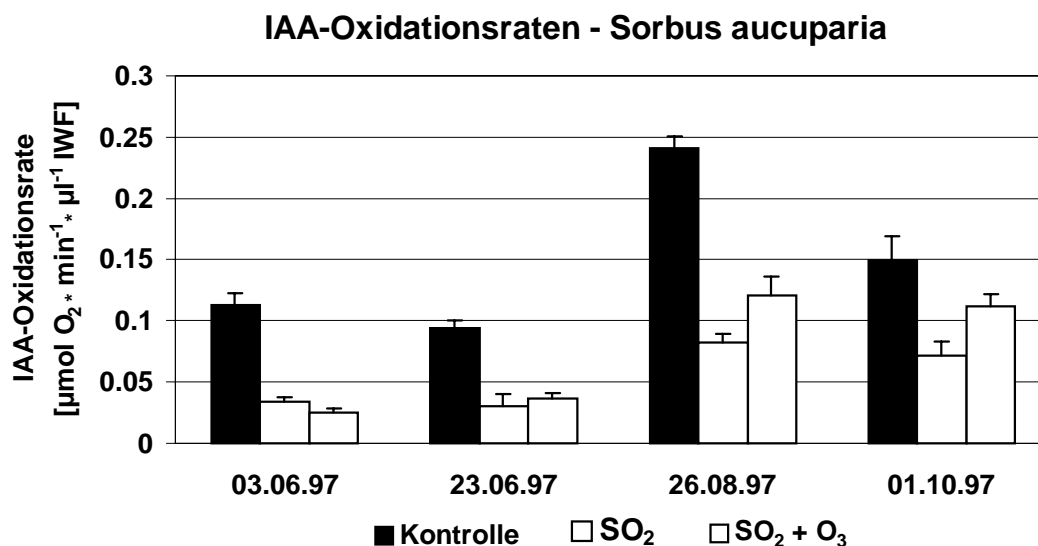


Abbildung 43: Einfluß chronischer Belastung mit den Luftschadstoffen SO₂ und Ozon auf die IAA-Oxidationsraten von Peroxidasen des Blatt-Apoplasten von *Sorbus aucuparia*.

Die Ähnlichkeiten zwischen Sulfitoxidation und IAA-Oxidation, die auch bei dem untersuchten Altbaum deutlich erkennbar waren (vgl. Abbildung 38), legen die Schlußfolgerung nahe, daß es sich bei beiden Umsetzungen um Reaktionen handelt, die von den gleichen Enzym-Isoformen katalysiert werden. Dies würde eine verhältnismäßig geringe Substratbindungsspezifität der Peroxidasen im Apoplasten voraussetzen. Die Existenz von Peroxidasen, die sowohl die Peroxidase-Funktionen im engeren Sinne, als auch IAA-Oxidase-Funktionen gleichzeitig erfüllen können, ist seit längerem bekannt [SCHNEIDER und WIGHTMAN, 1974, SRIVASTAVA und VAN HUYSTEE, 1977]. Einen Beweis, daß dies auch für apoplastische Peroxidasen gilt, erbrachte JANKOWSKY [1993] an elektrophoretisch aufgetrennten Peroxidase-Isoformen aus Fichten-Nadeln (*Picea abies*). Bei allen Isoformen der mit der apoplastischen Waschflüssigkeit extrahierten Peroxidasen konnte sowohl IAA-Oxidase-Aktivität als auch die Umsetzung von Guajacol mit H₂O₂ nachgewiesen werden. Wie bereits in Kap. 4.2.3.2 ausgeführt, ist davon auszugehen, daß dieses Substrat auch von sulfitoxidierenden Peroxidasen umgesetzt wird.

Welche der möglichen Reaktionen von den Peroxidasen katalysiert wird, ist unter diesen Voraussetzungen vermutlich von den lokalen Milieubedingungen und vom Vorhandensein der entsprechenden Cofaktoren bzw. Inhibitoren abhängig. Anhand von Untersuchungen an Zellwand-Peroxidasen von *Lupinus albus* schlußfolgerten ROS BARCELO et al. [1987], daß der enzymatische Polymorphismus der Peroxidasen mit deren Interaktionen mit Phenolen in Zusammenhang steht. Die Autoren postulierten das Vorhandensein sogenannter „phenolinduzierter Konformere“ der Enzymmoleküle.

Eine weitere Möglichkeit, die das ähnliche Verhalten Sulfit- und IAA-oxidierender Peroxidasen erklären könnte, wäre das Vorhandensein von Isoformen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten, die aber in ihrer Aktivität, bzw. in den Apoplasten exportierten Menge gleich reguliert sind. Dies würde bedeuten, daß die Stimulierung des Exports in den Apoplasten und die Regulation der Aktivität in diesem Falle über die gleichen Signale vermittelt würde. Hierfür kommen vor allem Calcium, Wasserstoffperoxid oder niedermolekulare Phenole in Frage.

4.3.10 Isoelektrische Fokussierung der Peroxidase-Isoformen

Zur Untersuchung des Musters der apoplastischen Peroxidase-Isoformen unter dem Einfluß der Immissionsbelastung wurden die IWF-Proben einer gelelektrophoretischen Auftrennung unterzogen (vgl. Kap 3.8).

Es kann davon ausgegangen werden, daß alle Peroxidase-Isoformen nach Aktivfärbung mit Guajacol, Benzidin und H_2O_2 ein identisches Reaktionsprodukt bilden und die Intensität der Färbung mit der Menge dieses Produkts, d.h. mit der Aktivität der jeweiligen Isoform korreliert. Demzufolge können nicht nur qualitative Aussagen anhand des Bandenmusters getroffen werden, sondern es sind auch semiquantitative Vergleiche der jeweils im gleichen Gel aufgetragenen Proben mit Hilfe der Densitogramme möglich.

Bei allen drei Baumarten wurden vorwiegend saure Isoformen im pH-Bereich zwischen pH 3 und pH 5,5 detektiert. Im schwach sauren bis neutralen Bereich zwischen pH 5,5 und pH 7 wurde bei allen Baumarten eine geringere Anzahl Banden mit etwas schwächerer Intensität gefunden. Im schwach basischen Bereich waren ein bis maximal drei Isoformen vorhanden. Die individuellen Bandenmuster der drei Baumarten unterschieden sich jedoch, wie die Abbildung 44 zeigt, deutlich voneinander. Besonders auffällig war hierbei die Häufung intensiv gefärbter Banden im Bereich um pH 5 bei *Fagus sylvatica*.

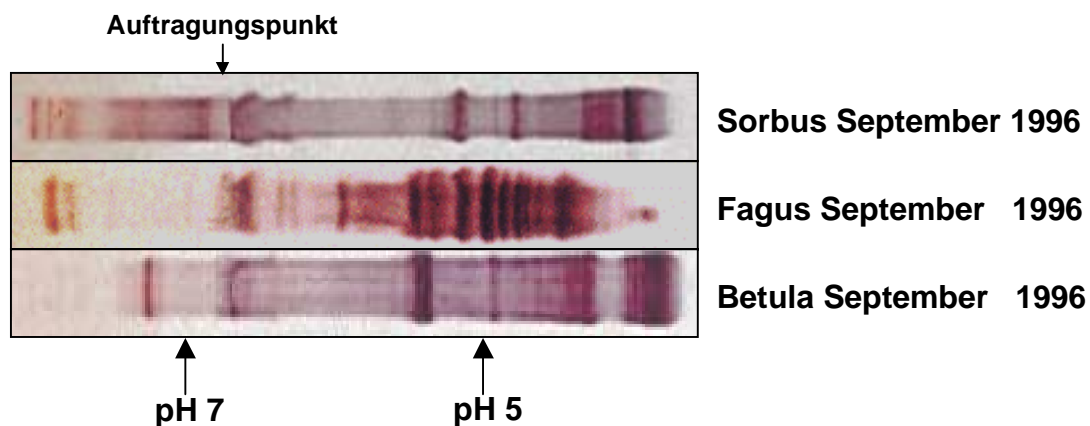


Abbildung 44: Bandenmuster der Peroxidase-Isoformen in IWF-Proben von *Sorbus aucuparia*, *Fagus sylvatica* und *Betula pendula* nach Anfärbung mit Benzidin und Guajacol. Die Proben wurden von Kontroll-Pflanzen des Immissionsstreß-Versuches gewonnen. Es wurden jeweils 7 µl IWF aufgetragen.

Unter Belastung mit Luftschadstoffen war bei keiner Baumart eine deutliche Veränderung der Banden-Zahl erkennbar. Bei einigen Isoformen änderte sich jedoch die Aktivität im Verhältnis zu anderen Isoformen der gleichen Probe und im Verhältnis zur jeweiligen Isoform mit gleichem Isoelektrischen Punkt (pI) in den Proben der anderen Behandlungsvarianten. Dies wurde durch das densitometrische Gel-Auswertungsverfahren, bei dem die Breite und Farbintensität der Banden gemessen wurde, als Veränderung der Peakhöhen und -breiten in den Scans deutlich erkennbar.

Die diesbezüglich auffälligsten Veränderungen vollzogen sich bei *Betula pendula*. Die Unterschiede waren dabei in der Vegetationsperiode 1997 deutlicher als im Jahr davor. Die am weitesten im sauren Bereich liegende Bande (Bande Nr.1, Abbildung 45 und Abbildung 46) war dabei unter Begasung mit Luftschadstoffen geringer ausgeprägt als bei den

Kontrollen, während die daneben liegende Isoform (Nr.2) bei der SO₂-Variante offenbar eine höhere Aktivität aufwies, als bei den beiden anderen Varianten. Die deutlichsten Unterschiede wurden jedoch bei einer Peroxidase mit einem knapp oberhalb von pH 5 liegenden pI gefunden (Nr.7). Die entsprechende Bande war bei allen Proben sehr markant. Sie verstärkte sich im Verlauf der Vegetationsperiode und war ab August, bzw. September bis zur letzten Probenahme im Oktober bei den SO₂+O₃-Proben die bei weitem am intensivsten ausgeprägte Bande. Auch im Vergleich zu den anderen Behandlungsvarianten war diese Isoform unter Einwirkung der Schadstoffkombination verstärkt in der IWF vorhanden. Ähnliches gilt auch für eine Isoform mit einem pI von etwa 4,5 (Nr.5). Diese war bei beiden Schadstoff-Varianten im Spätsommer und Herbst beider Jahre stärker als bei den Kontrollen vertreten. Die Banden 14 bis 16 zeigten teilweise Intensitätsunterschiede, diese waren aber offensichtlich nicht an eine bestimmte Behandlungsvariante geknüpft.

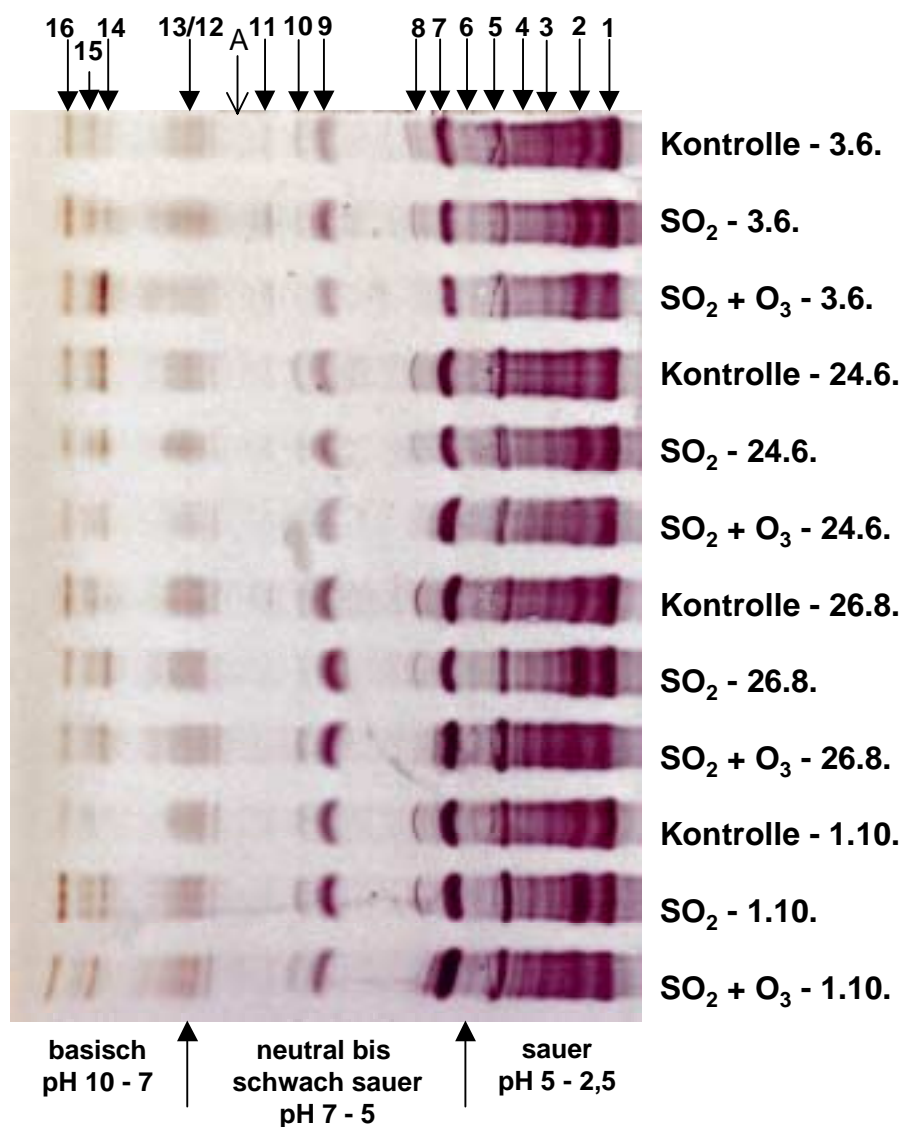


Abbildung 45: Bandenmuster der Peroxidase-Isoformen von *Betula pendula* im Verlauf der Vegetationsperiode 1997. Isoelektrische Fokussierung nach Auftragung von jeweils 7 µl IWF, Anfärbung mit Guajacol und Benzidin. A = Auftragungspunkt der Proben

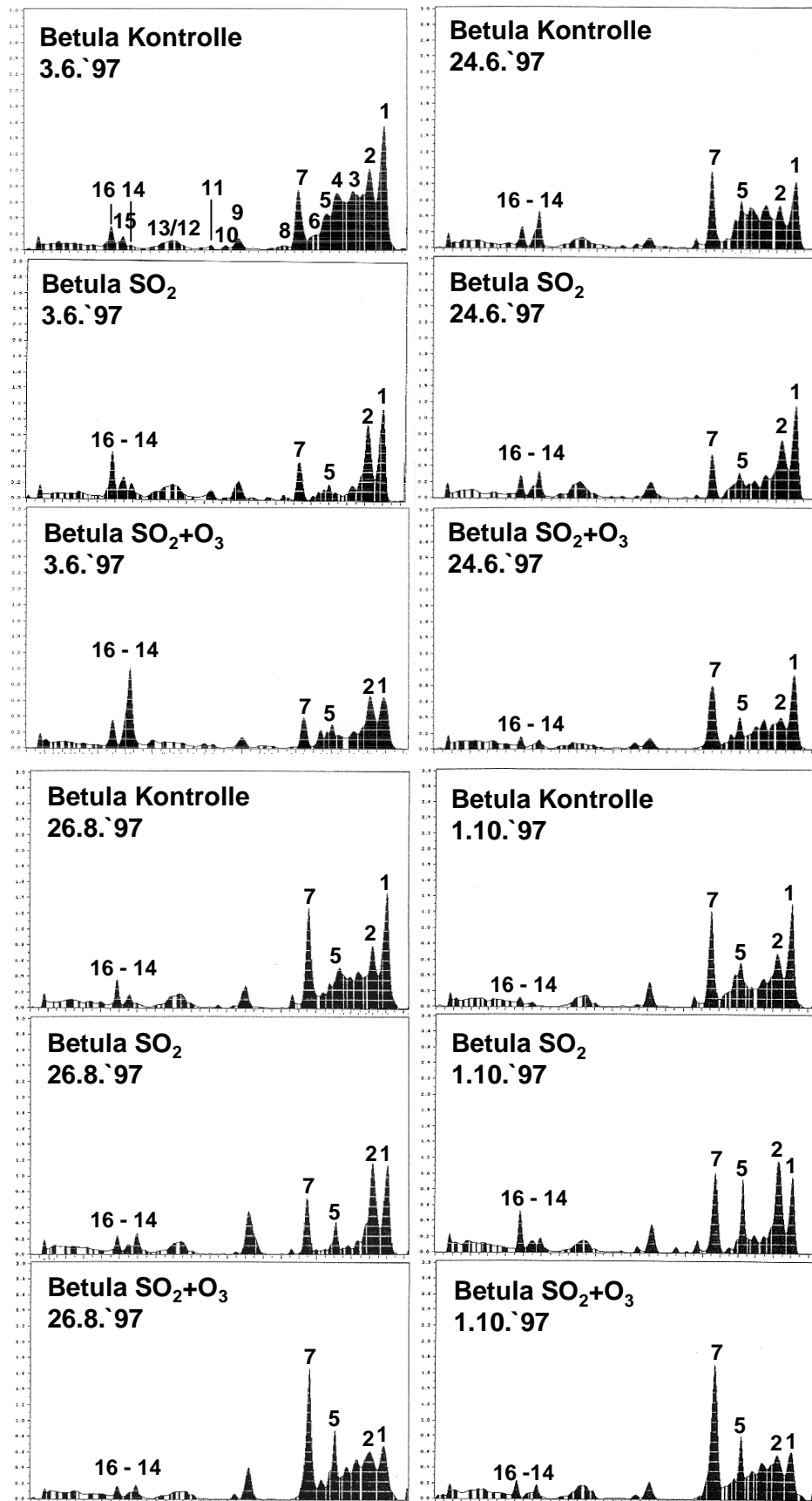


Abbildung 46: Densitogramme der in Abbildung 45 dargestellten Bandenmuster von Peroxidasen aus dem Blatt-Apoplasten von *Betula pendula* nach isoelektrischer Fokussierung. Die Numerierung der Peaks entspricht der Numerierung der Banden in Abbildung 45.

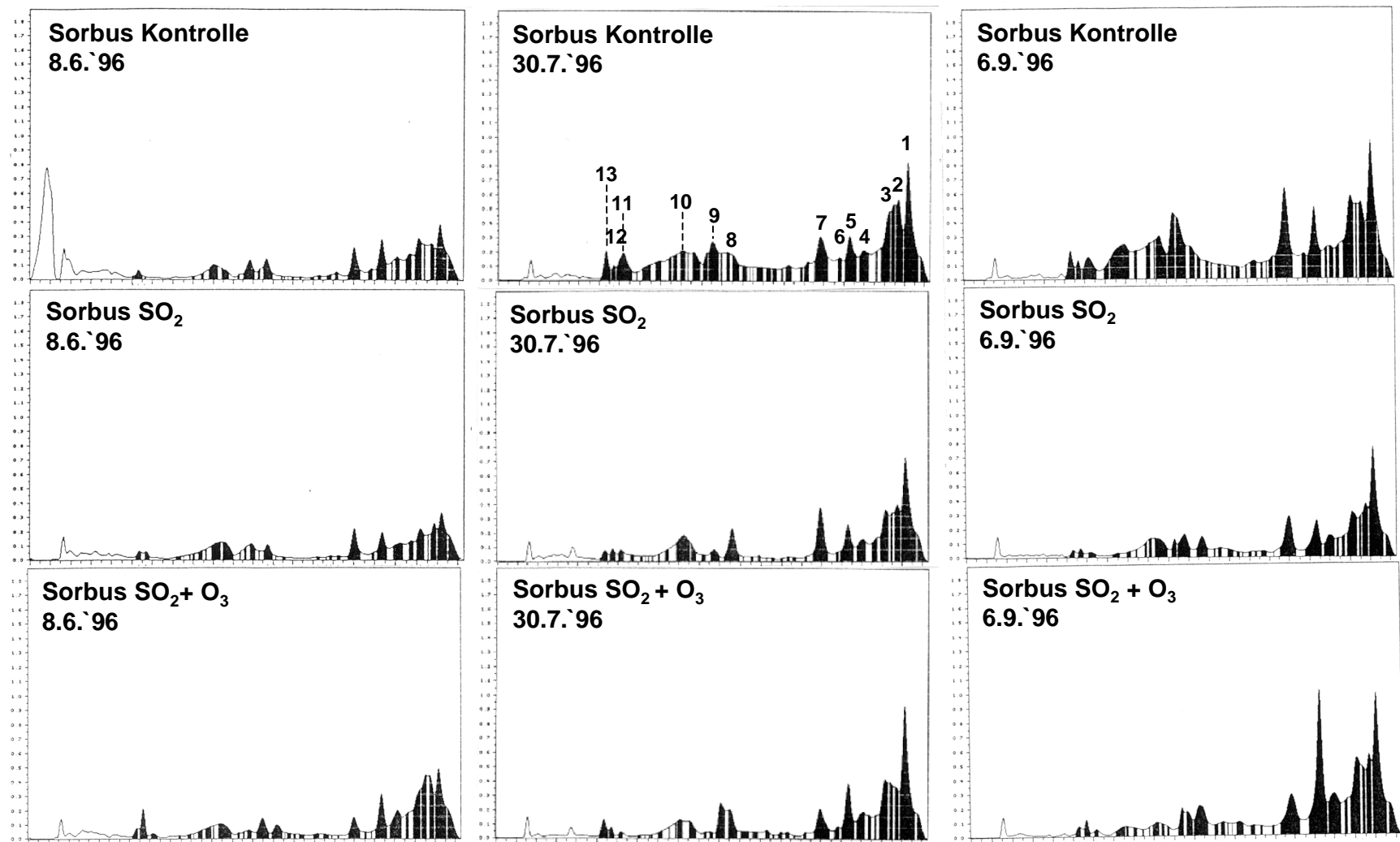


Abbildung 48: Densitogramme der in Abbildung 47 dargestellten Bandenmuster der Peroxidase-Isoformen von *Sorbus aucuparia*. Die Numerierung der Peaks entspricht derjenigen der Banden.

Bei *Fagus sylvatica* konnten anhand der Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung bei den verschiedenen Versuchsgruppen weder markante Unterschiede im Bandenmuster (Abbildung 49), noch im Peroxidase-Gesamtgehalt festgestellt werden. Der Peroxidasegehalt der IWF erhöhte sich lediglich im zeitlichen Verlauf der Vegetationsperiode bei allen Proben. Das Fehlen von deutlichen Unterschieden zwischen den Versuchsvarianten ist insofern überraschend, da zumindest in den Monaten Juli und September 1996 eine deutliche Erhöhung der enzymatischen Umsatzraten bei den mit Luftschadstoffen begasten Pflanzen gemessen wurde. Es ist jedoch möglich, daß eventuell vorhandene Unterschiede durch die intensive Färbung des Gels überlagert wurden, da zu hohe Farbindensitäten die densitometrische Auswertbarkeit des Bandenmusters mindern. Auf die Darstellung der Densitogramme wird aus diesem Grund verzichtet. Weitere Untersuchungen waren jedoch aufgrund der geringen vorhandenen IWF-Mengen nicht möglich.

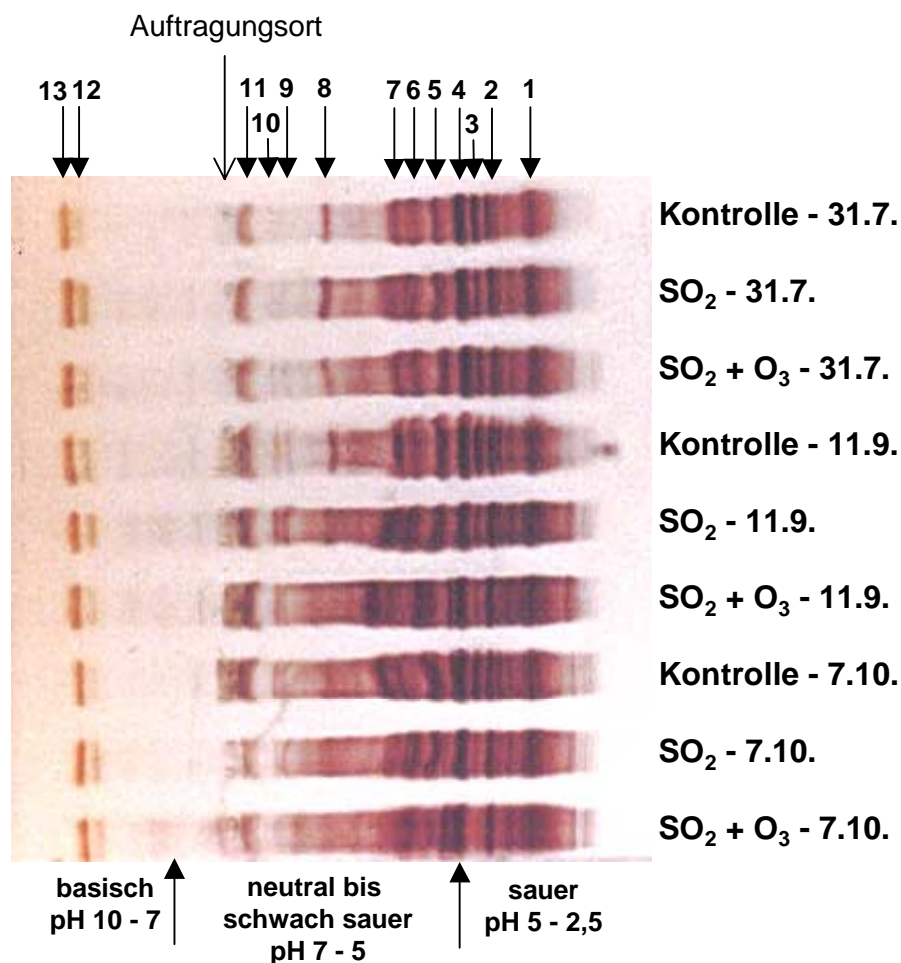


Abbildung 49: Bandenmuster der Peroxidase-Isoformen von *Fagus sylvatica* im Verlauf der Vegetationsperiode 1996. Isoelektrische Fokussierung nach Auftragung von jeweils 7 µl IWF, Anfärbung mit Guajacol und Benzidin. Die Bahnen der Juni-Probenahme wurden abgetrennt, da eine Auswertung aufgrund des zu schrägen Laufs der Proben nicht möglich war.

4.3.11 Proteingehalt der IWF unter Immissionsbelastung

In den in Kapitel 4.1.3.2 ausgeführten allgemeinen Angaben zu den Ergebnissen der Proteinbestimmung wurden die methodischen Probleme dieser Messungen in der IWF bereits angesprochen. Aus diesem Grunde wurden die Proteingehalte der IWF nicht zu Angaben über die spezifische Aktivität herangezogen. Hinsichtlich der Beeinflussung des Proteingehaltes der IWF unter Belastung der Pflanzen mit Luftschadstoffen können jedoch einige allgemeine Aussagen aus den Ergebnissen abgeleitet werden.

Die Proteingehalte der SO₂+O₃-Proben waren überwiegend höher als die der beiden anderen Varianten, während bei den mit SO₂ begasten Pflanzen oft niedrigere Proteingehalte festgestellt wurden als bei den entsprechenden Kontrollen.

Die gemessenen Umsatzraten korrelierten nicht mit dem gemessenen Proteingehalt der Proben.

Der Anteil des Peroxidaseproteins am Gesamtprotein in der IWF ließ sich aufgrund der großen Fehlergrenzen der Ergebnisse nicht mit der notwendigen Sicherheit ermitteln. Literaturangaben über den Anteil „HRP-ähnlicher Peroxidase“ am Gesamtprotein von Fichten-IWF schwanken zwischen 0,5% und 15% [PFANZ und OPPMANN, 1991; JANKOWSKY, 1993]. VAN DEN BERG und VAN HUUSTEE [1984] gaben einen Peroxidasegehalt von 15% des gesamten Proteins in „interzellulärem Fluid“ aus Petunien-Sproßachsen an. Dieses Fluid wurde auf ähnliche Weise wie die hier untersuchte IWF gewonnen. Die eigenen Ergebnisse deuten an, daß der Anteil der Peroxidasen bei den untersuchten Laubbaumarten wahrscheinlich oberhalb von 15% liegt.

Mit Hilfe der Umsatzraten der bei vielen Messungen in der zweiten Probenahmeperiode als Referenz mitgeführten Meerrettichperoxidase (HRP) wurde eine Kalkulation der katalytischen Aktivität der IWF-Peroxidasen durchgeführt. Hierfür wurden die Umsatzraten der apoplastischen Peroxidasen entsprechend den Angaben des HRP-Herstellers (Sigma) über die Aktivität der Meerrettichperoxidase in HRP-units umgerechnet. Nach diesen Berechnungen ergaben sich für *Betula pendula* Werte zwischen rund 13 und 48 HRP-units pro ml IWF und für *Sorbus aucuparia* zwischen 6 und 47 HRP-units pro ml. Aufgrund dieser Berechnungen und bei Zugrundelegung der Hersteller-Angaben zur spezifischen Aktivität der Meerrettichperoxidase erscheinen Peroxidaseprotein-Anteile zwischen 20 und 50% am Gesamtprotein der IWF durchaus möglich.

Hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten ergab die überschlagsweise Berechnung der proteinbezogenen, spezifischen Aktivitäten insbesondere bei den SO₂+O₃-Varianten von *Sorbus* deutlich niedrigere Werte als bei den beiden anderen Varianten. Aber auch die spezifischen Aktivitäten der SO₂-Proben lagen häufig unter denen der Kontrollen. Der Anteil der Peroxidasen am gesamten Proteingehalt der IWF war demzufolge vermutlich bei den Kontrollen am höchsten und unter kombinierter SO₂- und O₃-Begasung am geringsten.

Auch bei *Betula* war die spezifische Aktivität in den SO₂+O₃-Proben am niedrigsten, während diejenige der SO₂-Proben häufig ebenso hoch wie bei den Kontrollen, bzw. sogar höher war. Sofern die spezifische Aktivität höher war, standen einem im Vergleich zu den Kontrollen etwas niedrigeren Proteingehalt der SO₂-Proben gleiche oder etwas höhere Umsatzraten gegenüber. Die hohen Umsatzraten der Peroxidasen unter SO₂- und Ozon-Begasung gingen dagegen mit hohen Proteingehalten einher. Der Anteil an Proteinen im Apoplasten, der nicht

durch Peroxidasen repräsentiert wird, ist aber in jedem Falle erheblich und kann die geringe Korrelation der Umsatzraten mit dem Proteingehalt der Proben erklären.

Der erhöhte Proteingehalt der mit SO₂ und Ozon begasten Proben könnte durch die Synthese von Streßproteinen und deren Export in den Apoplasten bedingt sein. SANDERMANN et al. [1989] beobachteten die Induktion von Streßproteinen bei *Picea* und *Pinus* nach kurzzeitiger Begasung mit hohen Ozondosen und nach chronischer Schädigung mit einem Gemisch aus Ozon und saurem Nebel. Die meisten bekannten Streßproteine werden in der Zellwandphase akkumuliert. Häufig handelt es sich dabei um verschiedene Enzymproteine, in der Zellwandphase kommen aber auch hydroxyprolinreiche Glycoproteine (HRGP), oder sogenannte „nekrogene Proteine“ in Frage. Letztere stehen jedoch vorwiegend mit akuten Schädigungen, bzw. mit hypersensitiven Reaktionen in Zusammenhang [SCHLEE, 1992].

Eine Untersuchung über Veränderungen der Proteinausstattung des Apoplasten unter Schadstoffeinwirkung, die vor allem ein breiteres Spektrum der Zellwand-Enzyme berücksichtigt, erscheint daher interessant.

4.3.12 Zusammenfassung

Die Peroxidaseaktivität im Blatt-Apoplasten unterlag bei den untersuchten Laubbaumarten einer saisonalen Dynamik, die bei *Fagus sylvatica* am stärksten ausgeprägt war und bei *Betula pendula* am wenigsten deutlich hervortrat.

Die Sulfit- und die IAA-Oxidation zeigten ähnliche Verläufe. Es besteht demzufolge einerseits die Möglichkeit, daß es sich bei den isolierten Peroxidasen um Enzyme handelte, die beide Reaktionen katalysieren konnten, andererseits könnten aber auch Enzyme mit verschiedenen Substratspezifitäten die einer ähnlichen Regulation unterliegen zu diesem Ergebnis geführt haben.

Unter Belastung mit Luftschadstoffen waren die Umsatzraten der Peroxidasen bei *Fagus* bis zum Beginn des Herbstes stets höher als diejenigen der Kontrollen zum vergleichbaren Zeitpunkt. Bei der letzten Probenahme Anfang Oktober lagen dagegen die Umsatzraten der aus den Kontrollpflanzen isolierten Enzyme höher als die der beiden anderen Varianten. Aufgrund der Verläufe der drei Aktivitätsprofile wird eine Verschiebung der Maxima und Minima der Enzymaktivität bei den schadstoffbelasteten Pflanzen um etwa einen Monat nach vorn vermutet. Dies könnte in ursächlichem Zusammenhang mit verfrüht einsetzender Seneszenz gestanden haben.

Bei *Betula pendula* wurde dagegen unter dem Einfluß von SO₂ und Ozon eine Steigerung der Peroxidaseaktivität in der zweiten Hälfte der Vegetationsperiode (etwa ab August) festgestellt. Es kann demnach nicht davon ausgegangen werden, daß die gesteigerte Enzymaktivität eine unmittelbare Abwehrreaktion gegen die Schadstoffbelastung widerspiegelt. Vielmehr führte vermutlich die Stimulierung anderer Prozesse, in deren Abfolge Peroxidasen integriert sind, zu dem beobachteten Anstieg der Umsatzraten. Die Katalyse der Sulfitoxidationsreaktion wäre somit als unspezifische Eigenschaft der Peroxidasen anzusehen.

Die hohe Peroxidaseaktivität stand, wie auch die Resultate der Messungen der IAA-Oxidationsraten nahelegen, vermutlich mit einem intensivierten IAA-Abbau in Zusammenhang. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Zellwand bzw. an der Plasmamembran aufgrund des oxidativen Stresses, trug sicherlich ebenfalls zur Erhöhung der Peroxidaseaktivität im Apoplasten bei. Eine Aktivierung durch niedermolekulare Phenole

oder Streß-Ethylen erscheint ebenfalls möglich. Ebenso müssen aufgrund der Beeinträchtigung der Integrität der Plasmamembran durch Einwirkung der Luftschadstoffe auch calciumvermittelte Prozesse in Betracht gezogen werden.

Bei *Sorbus aucuparia* wurde unter der Einwirkung der Luftschadstoffe eine verminderte Peroxidaseaktivität festgestellt. Für dieses Ergebnis könnte eine starke Reaktion der Pflanzen auf die kontinuierliche Belastungssituation verantwortlich sein. Eine infolgedessen eintretende Erschöpfungsreaktion könnte mit einem erhöhten Abbau bzw. mit einer verminderten Neusynthese der Enzymproteine einhergegangen sein.

Nach Untersuchungen zum Muster der verschiedenen Peroxidase-Isoformen mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung wurde festgestellt, daß bei keiner der drei Baumarten eine Veränderung der Anzahl isolierbarer Isoformen eintrat. Unter Belastung mit Luftschadstoffen variierte jedoch die Aktivität oder Menge bestimmter Enzym-Isoformen. Bei *Betula pendula* wurden diesbezüglich die markantesten Veränderungen beobachtet. Hier waren insbesondere im Bereich um pH 5 detektierbare Isoformen unter Einfluß von SO₂ und Ozon im Spätsommer als verstärkte Banden im Gel erkennbar. Ein Zusammenhang mit den *in vitro* gemessenen gesteigerten Umsatzraten kann angenommen werden.

Die Resultate der Untersuchungen bei *Sorbus* unterstützten die Vermutung einer verminderten Neusynthese von Peroxidaseproteinen, bzw. eines geringeren Exports dieser Enzyme in den Apoplasten, da die IWF-Proben der begasten Pflanzen Bandenmuster mit deutlich geringerer Farbintensität aufwiesen als die vergleichbaren Kontrollen.

Insgesamt veranschaulichen die Befunde der Untersuchungen an den drei ausgewählten Laubbaumarten in verschiedener Hinsicht die großen artspezifischen Unterschiede in den Reaktionen auf Immissionsstreß. Die Peroxidasen sind in unterschiedlichem Maße in die Streßreaktionen einbezogen, können jedoch bei keiner der drei Baumarten als rasch reagierende Indikatoren für eine Luftschadstoffbelastung fungieren.

4.4 Untersuchungen an *Fagus sylvatica* L. zu weiteren abiotischen und biotischen Streßfaktoren

Für das erfolgreiche Aufwachsen von Jungpflanzen aus Naturverjüngung oder Anpflanzungen ist nicht nur das Ausmaß der Belastung durch Luftschadstoffe sondern auch die Intensität der Einwirkung anderer Streßfaktoren wie beispielsweise Schädlingsbefall oder Trockenheit von großer Bedeutung. Letztere vermögen die Jungpflanzen aufgrund ihrer geringen Blattmasse und des noch wenig ausgebildeten Wurzelsystems deutlich stärker als Altbäume zu schädigen. Aus diesem Grunde wurden mit Buchen-Jungpflanzen Untersuchungen durchgeführt, die klären sollten, in welchem Maße bereits diese Faktoren eine komplexe Streßreaktion bei den Pflanzen hervorrufen können und ob bzw. mit welcher Intensität die Peroxidasen des Blattapoplasten in diese Reaktion einbezogen sind.

4.4.1 Einfluß von Blattverwundungen auf die Zellwand-Peroxidasen von Buchen-Jungpflanzen

Durch Tiere verursachte Fraßschäden an Blättern sind im Freiland nicht selten. Dies gilt insbesondere für Jungpflanzen, da diese nicht nur von Insekten erreicht werden können, sondern auch von Säugetieren wie z.B. Mäusen, Hasen oder Schalenwild. Auf Flächen, auf denen eine hohe Dichte von Jungpflanzen der gleichen Art herrscht (z.B. bei Wiederaufforstungen), ist die Gefahr von Massenentwicklungen herbivorer Insekten sehr hoch. Starke Fraßschäden an Buchenblättern verursachen beispielsweise der Buchenspringgrübler (*Rhynchaenus fagi*) und der Buchenprachtkäfer (*Agrilus viridis*) [INSTITUT FÜR WALDBAU GÖTTINGEN, 1992].

Um den Einfluß mechanischer Blattschädigung auf die apoplastischen Peroxidasen zu untersuchen, wurden gezielte Verwundungen der Blätter mit Hilfe von Korkbohrern herbeigeführt (vgl. Tabelle 4 Kap. 3.1.2.3).

Um die aufgrund der warmen und trockenen Witterung rasch trocknenden Wundränder bildete sich innerhalb der darauffolgenden zwei bis drei Stunden eine etwa 0,5 bis 1 mm breite, braun verfärbte Zone, die an den darauffolgenden Tagen unverändert blieb.

Die Peroxidaseaktivität in der IWF wurde sowohl kurze Zeit nach der Verwundung (1 – 4 Tage), als auch nach einer längeren Frist (10 Tage und 3 Wochen) gemessen.

In der Abbildung 50 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefaßt. Die Tabelle 17 enthält die Signifikanzniveaus (als Irrtumswahrscheinlichkeit p) derjenigen Versuchsgruppen, die unter Anwendung des U-Tests nach MANN und WHITNEY [1947] miteinander verglichen wurden und bei denen ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Die Aktivität der Peroxidasen der verwundeten Blätter blieb kurz nach der Verwundung zunächst etwa auf dem Niveau der vergleichbaren Kontrollen. Am zweiten Tag nach Versuchsbeginn wurden dagegen bei den Varianten Va und Vb deutliche Veränderungen festgestellt. Die Peroxidasen aus Blättern mit einer großflächigen Verwundungsstelle (Va) und aus Blättern mit mehreren kleinen Wunden (Vb) hatten bereits 48 h nach Versuchsbeginn im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Umsatzraten. Dieser Trend war 72 h nach Versuchsbeginn noch deutlicher ausgeprägt, die Enzymaktivitäten dieser beiden Varianten waren nochmals um rund 20 (Va) bis 30% (Vb) im Vergleich zum Vortag gestiegen. Die

Umsatzraten lagen damit bei der Variante Va etwa um 60% und bei Variante Vb um rund 90% über den Kontrollen. Am vierten Tag nach der Verwundung der Blätter hatte die Enzymaktivität bei der Variante Va bereits ihr Maximum überschritten. Die gemessenen Umsatzraten lagen wieder fast auf dem Ausgangsniveau. Allerdings zeigten die Meßwerte eine hohe Standardabweichung. Die Umsatzraten der Variante Vb stiegen ebenfalls nicht weiter an, blieben aber, im Gegensatz zu Va, auf gleicher Höhe wie am Vortag. Die Aktivität der Peroxidasen aus Blättern mit einer kleinflächigen Verwundung (Vc) zeigte hingegen an diesem Versuchstag erstmalig einen deutlichen Anstieg, nachdem an den davor liegenden Tagen keine Veränderung zum Ausgangsniveau festgestellt werden konnte.

Um die längerfristigen Auswirkungen der Blattverwundung zu untersuchen, wurden bei der Variante Vb 10 Tage und 3 Wochen nach Versuchsbeginn weitere Proben entnommen. Dabei wurden nach 10 Tagen signifikant erhöhte Umsatzraten im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle festgestellt. Die Enzymaktivität war nach dieser Zeitspanne noch etwa um 55% höher als bei den Kontrollen. Dagegen lag der Mittelwert der Umsatzraten nach drei Wochen unter dem der Kontrollen.

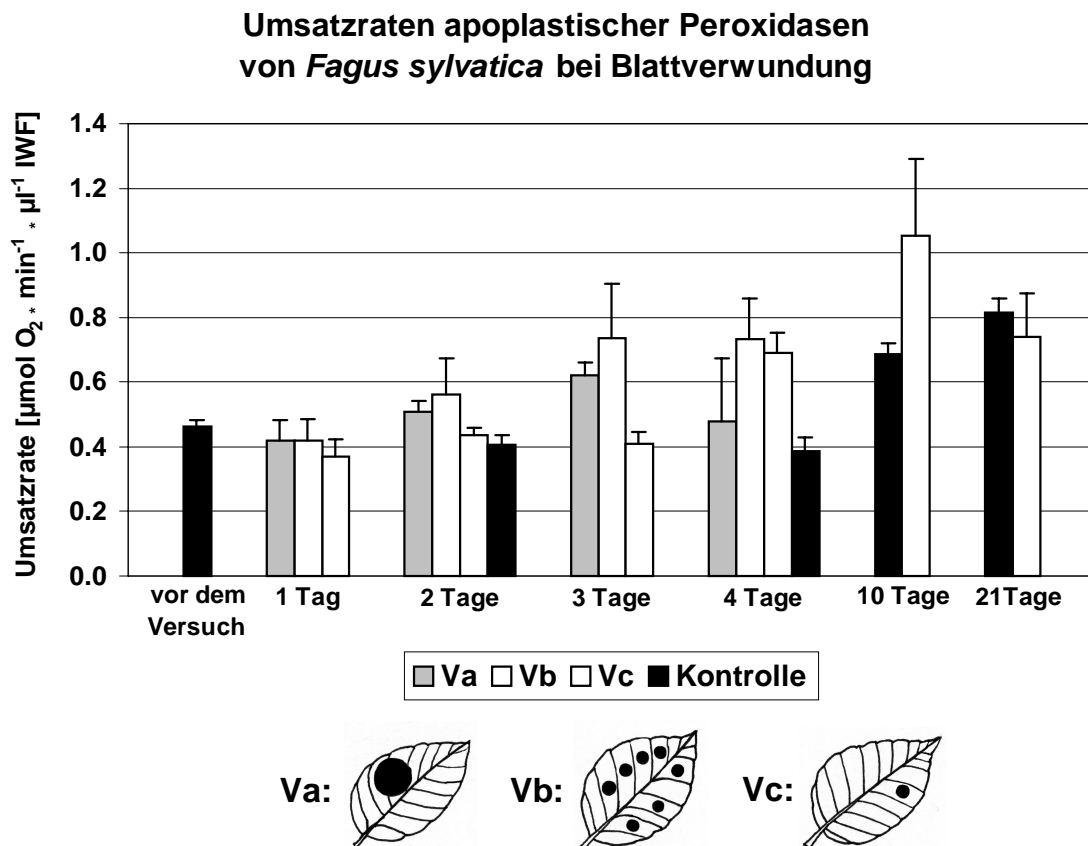


Abbildung 50: Umsatzraten apoplastischer Peroxidasen von *Fagus sylvatica* nach Blattverwundung. Die Enzymaktivität wurde *in vitro* als Sauerstoffzehrung bei der Sulfitoxidationsreaktion gemessen. In der Grafik sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 8 Parallelmessungen dargestellt. Die Bezeichnungen der Versuchsvarianten entsprechen den in der Tabelle 4 (Kap. 3.1.2.3) angegebenen.

Tabelle 17: Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im Wundstreß-Versuch, angegeben als Irrtumswahrscheinlichkeit (p). Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit dem U-Test nach MANN und WHITNEY [1947] ermittelt. In der Tabelle sind lediglich diejenigen Gruppen aufgeführt, bei denen der Rangtest signifikante Unterschiede zeigte.

Gruppe	Va 2 Tage	Vb 2 Tage	Va 3 Tage	Vb 3 Tage	Vb 4 Tage	Vc 4 Tage	Vb 10 Tage
K 2 Tage	0,0008	0,0117	0,0005	0,0008	-	-	-
K 4 Tage	-	-	0,0005	0,0008	0,0008	0,0008	-
Va 3 Tage	-	-	-	0,0124	-	-	-
Va 4 Tage	-	-	-	-	0,0357	-	-
K 10 Tage	-	-	-	-	-	-	0,0008

Wie die Ergebnisse zeigen, war eine Erhöhung der Peroxidaseaktivität nach Blattverwundung sehr rasch und deutlich feststellbar. Den stärksten Effekt bewirkte dabei offenbar eine Verwundung an mehreren Stellen, da die Enzymaktivität bei Variante Vb nicht nur deutlich höher als bei den Kontrollen war, sondern am dritten und vierten Tag nach der Verwundung auch signifikant höher als bei Variante Va. Offensichtlich war hierfür die Gesamtlänge der Wundränder von entscheidender Bedeutung. Diese betrug bei der Variante Vb mehr als das Zweieinhalbfache von Va, während die Gesamtfläche der Verwundung bei beiden Varianten gleich war. Dementsprechend hatte die Blattverwundung an einer Stelle mit geringem Kreisumfang (Vc) zunächst die geringsten Auswirkungen auf die Zellwand-Peroxidasen. Der deutliche Anstieg der Enzymaktivität vier Tage nach der Verwundung scheint nicht auf eine akute Wundreaktion zurückzuführen zu sein. Hier waren möglicherweise verschiedene Sekundärreaktionen beteiligt, die erst mit einer gewissen Verzögerung zu einem meßbaren Anstieg der Peroxidaseaktivität führten.

Mit Hilfe der Untersuchungen nach 10 Tagen und drei Wochen konnte der zeitliche Rahmen der Wundreaktion abgeschätzt werden. Die Streßantwort dauerte demzufolge, obwohl makroskopisch keine weiteren Veränderungen an den Blättern festgestellt werden konnten, relativ lange an. Nach 10 Tagen war die Peroxidaseaktivität gegenüber den Kontrollen immer noch deutlich erhöht. Erst in dem Zeitraum zwischen 10 Tagen und drei Wochen sanken die Umsatzraten wieder auf das Niveau der Kontrollen ab.

Die biochemisch-physiologischen Prozesse, die nach einer Verwundung in den Pflanzen ablaufen, sind vielfältig und trotz der zunächst lokalen Beeinträchtigung der Pflanzen systemübergreifend. Eine ausführliche Übersicht über verschiedene grundlegende Wundstreß-Reaktionen findet sich bei DAVIES [1987]. Die Funktion der Peroxidasen im Rahmen dieser Reaktionen steht wahrscheinlich sowohl mit Wundverschluß- und Festigungsprozessen in der Zellwand (d.h. Suberinisierung und Lignifizierung an der Verwundungsstelle und generelle

Festigung der Fibrillenstruktur der Zellwände), als auch mit der Regulation der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies in Zusammenhang [CIPOLLINI, 1998]. Die Bildung dieser Moleküle (vor allem H_2O_2 und O_2^-) erfolgt innerhalb von Stunden nach einer Verwundung und ist systemisch („oxidative burst“). Sie wird unter anderem durch das Polypeptid Systemin, Oligogalacturonsäure-Fragmente aus der Zellwand und Methyljasmonat induziert [OROZCO-CARDENAS und RYAN, 1999].

Die Kontrolle der Konzentration von H_2O_2 und anderen reaktiven Sauerstoffspezies ist von größter Bedeutung für die Steuerung der Wundstreß-Reaktionen, da diese Moleküle mit hoher Wahrscheinlichkeit in verschiedene Signalketten involviert sind. So schlugen KAWANO und MUTO [2000] einen Weg vor, bei dem durch Peroxidase unter Beteiligung von H_2O_2 und Salicylsäure das Superoxid-Radikal gebildet wird, welches eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt, wodurch es im weiteren Verlauf zur Induktion verschiedener Gene kommt. Von einer Wechselwirkung zwischen H_2O_2 und Salicylsäure gehen auch SCOTT et al. [1999] aus. Nach einem Modell von OROZCO-CARDENAS et al. [2001] induzieren Oligogalacturonsäure-Fragmente der Zellwand die Bildung von H_2O_2 , das als „second messenger“ fungiert und in Mesophyllzellen Gene aktiviert, deren Produkte in die Streßantwort integriert sind (z.B. Polyphenol-Oxidase oder Proteinase-Inhibitoren). WATANABE und SAKAI [1998] postulierten anhand der Ergebnisse ihrer Untersuchungen an *Cucurbita maxima* ein Modell, bei dem unter Vermittlung von reaktiven Sauerstoffspezies und Jasmonsäure eine Induktion des Aminocyclopropan-Carboxylat-Synthase-Gens erfolgt, wodurch letztlich die Ethylensynthese gesteigert wird.

Diese Signalwirkungen des H_2O_2 und nicht zuletzt auch die Toxizität reaktiver Sauerstoffspezies machen eine strenge Kontrolle der Konzentration solcher Verbindungen unerlässlich. Die mögliche Funktion der Peroxidasen bei der Regulation der H_2O_2 -Konzentration und die Wechselwirkungen zwischen Ethylen und Zellwand-Peroxidasen wurde bereits in Kapitel 4.3.9.2 diskutiert. Auch die Rolle des Calciums im Zusammenhang mit einer Erhöhung der Peroxidase-Aktivität im Apoplasten wurde in den vorangegangenen Kapiteln mehrfach erläutert (vgl. Kap. 1.4; 4.2.3 und 4.3.9.2). Die bei *Fagus sylvatica* festgestellte Erhöhung der Peroxidaseaktivität nach mechanischer Blattschädigung kann somit unstrittig als Bestandteil der Wundstreß-Reaktion gesehen werden. Der rasche und deutliche Anstieg der Enzymaktivität entspricht den Erfordernissen der Pflanze bei Blattverwundung, da dies eine akute Schädigung darstellt, bei der möglichst schnell ein Wundverschluß und eine Abwehr eventuell eindringender Pathogene sowie eine Hemmung der Fraßaktivität herbivorer Tiere herbeigeführt werden muß.

Die relativ lange Zeitspanne in der nach der Verwundung noch eine deutlich erhöhte Peroxidaseaktivität meßbar war, könnte ebenfalls im Zusammenhang mit der nachhaltigen Abwehr von Fraßfeinden gestanden haben. Schlüssige Erkenntnisse über derartige Langzeitprozesse nach Verwundung stehen jedoch noch aus.

4.4.2 Untersuchungen zu den Auswirkungen des Befalls mit *Phyllaphis fagi*

Die Buchenblatt-Baumlaus *Phyllaphis fagi* stellt insbesondere aufgrund ihres massenhaften Auftretens eine erhebliche Gefährdung für Buchen-Jungpflanzen dar. Die überwinterten Eier dieser Spezies werden von den Weibchen im Herbst vor allem an Knospen und Rindenrissen angeheftet. Der Schlupf der neuen Insektengeneration erfolgt zeitgleich mit dem

Laubaustrieb, so daß die sich entwickelnden jungen Blätter sehr schnell von einer großen Anzahl von Blattläusen besiedelt werden, die sich, an den Blattunterseiten sitzend, von Phloemsaft ernähren. Aufgrund der Saugtätigkeit und der Einwirkung des Speichels der Insekten kommt es zu Wachstumsretardierungen und Verkrüppelungen der Blätter und Triebe [BURSCHEL und VITE, 1951; HARTMANN et al., 1988; STEFFENS, 1996].

Wie bereits in Kapitel 3.1.2.1 erwähnt, wird das Gefährdungspotential dieser Insektenart für Buchenvoranbauten im Osterzgebirge als hoch eingeschätzt [OTTO, 1995; STEFFENS, 1996]. Dieser Umstand und die im Verlauf des OTC-Versuches gemachten Erfahrungen verdeutlichen die Notwendigkeit, die Folgen eines Befalls der Buchen mit *Phyllaphis fagi* zu untersuchen.

Um einen raschen Totalausfall der Versuchspflanzen zu vermeiden wurde der hier durchgeführte Versuch etwa 5 Wochen nach dem Einsetzen des Knospenaustriebes begonnen (vgl. Kap. 3.1.2.1). Dennoch wurden alle Versuchspflanzen schnell von *Phyllaphis fagi* besiedelt. Die Abbildung 51 zeigt Zweige einer stark befallenen Pflanze und das typische Befallsbild auf der Unterseite der Blätter.



Abbildung 51: Zweige von *Fagus sylvatica* mit starkem Befall durch *Phyllaphis fagi* (links) und charakteristisches Befallsbild auf der Blattunterseite (rechts). Die bläulichweißen Wachswoll-Ausscheidungen der Insekten sind deutlich sichtbar.

Der Blattlausbefall führte zur Aufkrümmung der Blattspreiten wie dies in der Abbildung 51 erkennbar ist und zu partiellen Vergilbungserscheinungen, die jedoch nur schwach ausgeprägt waren. Die stark befallenen Blätter zeigten zum großen Teil eine einheitliche, graugrüne Färbung. Die im Freiland häufige und auch in den Open-Top-Kammern beobachtete Deformation der Blätter zeigte sich aufgrund des späteren Versuchsbeginns nur in sehr geringem Ausmaß. Dagegen bildeten sich auf den Blättern nach etwa 4 bis 6 Wochen schwarz gefärbte Beläge an den Stellen aus, an denen sich Ausscheidungen der Blattläuse angesammelt hatten. Es kann daher von einer großflächigen Besiedelung der betroffenen Blattoberflächen durch Mikroorganismen ausgegangen werden. Nach Untersuchungen von STADLER et al. [2000] handelt es sich dabei hauptsächlich um Bakterien und Hefen. Eigene

rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten aber auch das Vorkommen von mycelbildenden Pilzen (Abbildung 52).

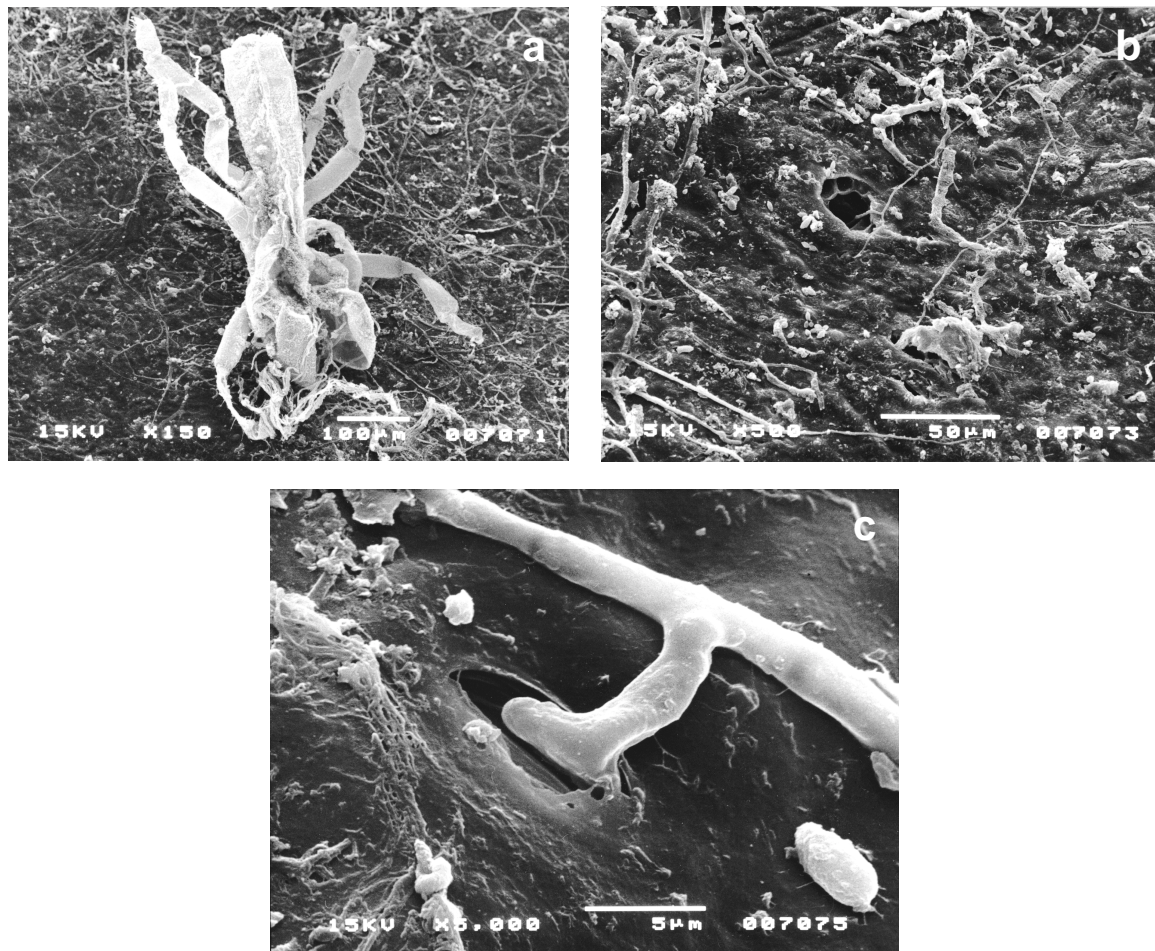


Abbildung 52: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Blattunterseiten mit *Phyllaphis fagi* befallener Buchenblätter.

- a) Häutungshülle von *Phyllaphis fagi*.
- b) Mikroorganismen auf der Blattoberfläche und über Läsionen der Epidermis eindringende Pilzhyphen
- c) in eine Spaltöffnung eindringende Pilzhyphe

Die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes ergab zunächst keinen deutlichen Unterschied zwischen den befallenen Pflanzen und den Kontrollen. Nach einer Befallsdauer von 8,5 Wochen betrug der mittlere Chlorophyllgehalt der Versuchspflanzen immer noch rund 96% der Kontrollen (Abbildung 53). Die Meßdaten zeigten jedoch eine hohe Standardabweichung. Erst nach einem Befallszeitraum von etwa 11 Wochen war der Chlorophyllgehalt der befallenen Pflanzen deutlich gesunken. Die Blätter enthielten im Mittel nur noch rund 65% des Pigmentgehaltes der zeitgleich beernteten Kontrollpflanzen. Diese Differenz beruht jedoch nur zu einem Teil auf dem Absinken des Pigmentgehaltes der befallenen Blätter, da die bei den Kontrollpflanzen gewonnenen Proben zu diesem Zeitpunkt einen höheren Chlorophyllgehalt als nach 8,5 Wochen Versuchsdauer aufwiesen. Die Chlorophyllgehalte der befallenen Blätter waren aber nach 11 Wochen gegenüber den Kontroll-Werten beider Probenahmezeitpunkte signifikant verringert (U-Test; 8,5 Wochen: $p = 0,0472$; 11 Wochen: $p = 0,0001$).

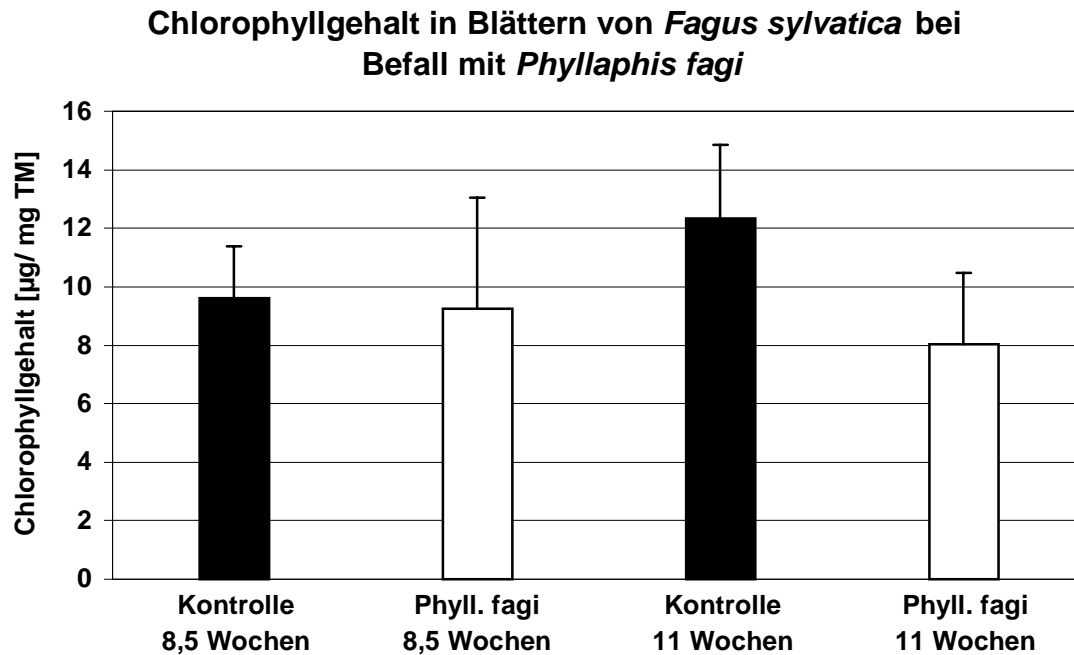


Abbildung 53: Gemittelte Chlorophyllgehalte der Buchenblätter nach 8 und 11 Wochen Versuchsdauer mit und ohne Befall durch *Phyllaphis fagi*. Die Beprobung der Kontrollpflanzen erfolgte jeweils zeitgleich mit der Probenahme bei den Pflanzen im Blattlausversuch. (n = 10 – 14)

Die Enzymaktivität der Zellwand-Peroxidasen wurde, aufgrund der benötigten Menge an Blattmaterial zur IWF-Isolierung erst nach einer weitgehenden Ausbreitung der Blattläuse über die Versuchspflanzen, nach etwa 4 Wochen, gemessen. Eine weitere Messung erfolgte nach zweimonatiger Befallsdauer. Es können demnach keine Aussagen zu den frühzeitig nach dem Beginn des Befalls ablaufenden Prozessen im Apoplasten gemacht werden.

Die Resultate der nach dieser vierwöchigen Anlaufphase durchgeführten Messungen sind in Abbildung 54 zusammengefaßt. Die gewonnenen Ergebnisse belegen eine deutliche Stimulierung der apoplastischen Peroxidasen bei Befall der Blätter mit *Phyllaphis fagi*. Nach einem Versuchszeitraum von 4 Wochen lagen die Umsatzraten der Peroxidasen der befallenen Pflanzen um rund 40% über den Raten der Kontrollen. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war signifikant (U-Test; $p = 0,0066$). Nach der Manifestation des Insektenbefalls scheint die Befallsdauer keinen weiteren stimulierenden Einfluß auf die Peroxidaseaktivität gehabt zu haben. Nach 8,5 Wochen wurde keine weitere Erhöhung der Umsatzraten, sondern vielmehr ein leichtes Absinken der Enzymaktivität festgestellt. Dies war jedoch sowohl bei den Versuchspflanzen als auch bei den Kontrollen der Fall, so daß der Unterschied dennoch knapp 50% betrug und signifikant war ($p = 0,0008$).

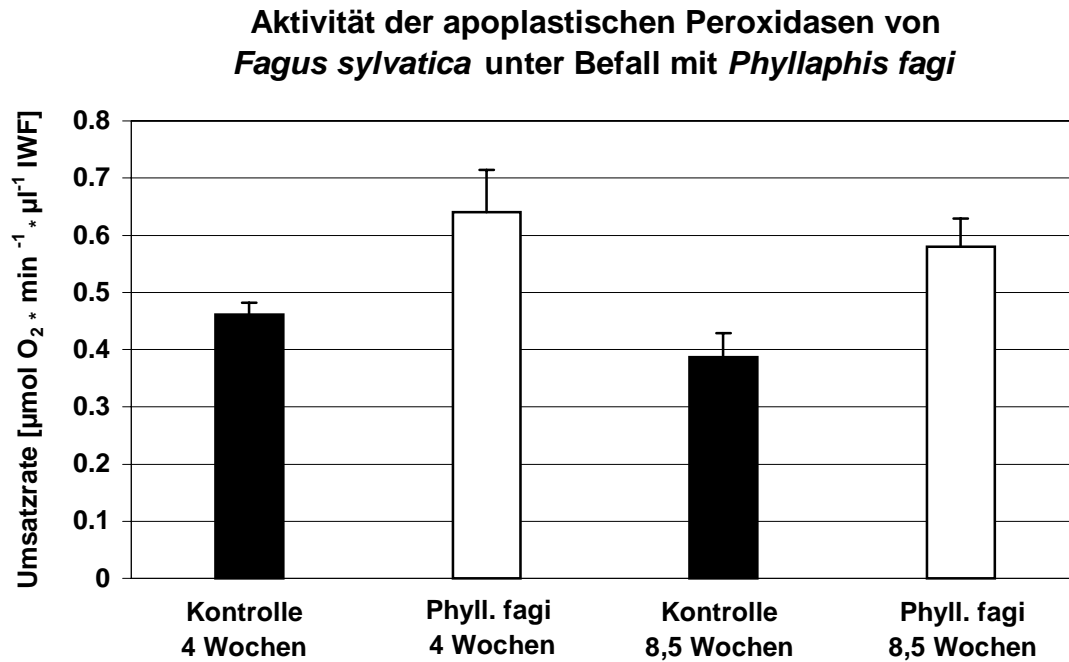


Abbildung 54: Umsatzraten der apoplastischen Peroxidasen mit *Phyllaphis fagi* befallener Buchenblätter im Vergleich zu den Umsatzraten aus Kontrollpflanzen isolierter Zellwand-Peroxidasen. Die Peroxidaseaktivität wurde *in vitro* anhand der Sulfitoxidationsreaktion bestimmt ($n = 8$).

Der Befall mit *Phyllaphis fagi* bewirkt Schädigungen der Blätter auf mehreren Ebenen. Neben der mechanischen Schädigung durch die Mundwerkzeuge der Insekten und dem Entzug von Assimilaten aus dem Phloem spielen die Speichelinwirkung der Tiere und die Besiedlung der Blattoberflächen mit Mikroorganismen als Folge des Blattlausbefalls eine wichtige Rolle bei der Auslösung einer Alarmreaktion in den Pflanzen.

Aufgrund dieser Vielzahl verschiedener Einflüsse, die als direkte oder indirekte Folge des Befalls mit Blattläusen auf die Pflanzen einwirken, ist die Induktion verschiedenster Streßreaktionen zu erwarten. Die Bedeutung der Peroxidasen im Rahmen der einsetzenden multiplen Abwehrreaktionen muß, ähnlich wie im bereits diskutierten Fall der Blattverwundung, vordergründig in der Wechselwirkung mit entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies und mit phenolischen Verbindungen bzw. Isoprenoiden gesehen werden. Insbesondere die Erhöhung der Festigkeit der Zellwände durch Lignifizierung und die verstärkte Vernetzung der Strukturpolysaccharide, einschließlich der Abdichtung bereits massiv zerstörter Zellen, kann die Schädigung der Blätter begrenzen und die Abwehr herbivorer Insekten unterstützen. Ebenso wird aber auch die peroxidasevermittelte Bildung reaktiver, inhibitorisch oder toxisch auf Insekten wirkender Verbindungen diskutiert, die die Freßbarkeit oder Verdaulichkeit der Nahrung mindern [APPEL, 1993; MILES und OERTLI, 1993; DOWD et al., 1998]. Verbindungen wie Zimtsäure-Derivate und andere phenolische Säuren, Catechine oder Terpenoide werden mit der Insektenresistenz in Zusammenhang gebracht. Diese Verbindungen sind zum Teil Peroxidase-Substrate oder treten mit reaktiven Verbindungen, die durch Peroxidasen generiert werden in Wechselwirkung. So sollen beispielsweise Chinone, die durch Peroxidasen gebildet werden, inhibitorisch auf

Verdauungsenzyme der Insekten wirken [GASPAR et al., 1982; DOWD, 1994; DOWD und LAGRIMINI, 1997].

Die Besiedelung der Blattoberflächen durch Mikroorganismen, die auch über die Spaltöffnungen oder durch die von Blattläusen verursachten Beschädigungen der Epidermis in das Blattinnere eindringen (siehe Abbildung 52), löste vermutlich ebenfalls eine Abwehrreaktion aus, in deren Verlauf die apoplastidären Peroxidasen stimuliert wurden. OSSWALD und ELSTNER [1988] diskutieren in diesem Zusammenhang eine Elicitorfunktion des Chitins der pilzlichen Zellwände. Es kommen jedoch auch andere Auslöser wie beispielsweise verschiedene Bestandteile des Speichels der Blattläuse oder nicht-wirtsspezifische Toxine der Pilze bzw. Bakterien in Frage [MILES, 1999; DAT et al., 2000].

Mit Hilfe der elektrophoretischen Auftrennung der Peroxidaseproteine konnte festgestellt werden, daß der Befall mit *Phyllaphis fagi* das verstärkte Auftreten mehrerer Enzym-Isoformen induzierte. Die Abbildung 55 stellt die Bandenmuster der Peroxidasen 4 und 8,5 Wochen nach Versuchsbeginn dar. In Verbindung mit den entsprechenden Densitogrammen (Abbildung 56) wird deutlich, daß insbesondere Peroxidase-Isoformen im sauren und schwach sauren pH-Bereich verstärkt im Apoplasten vorkamen, während eine Isoform im basischen Bereich in geringerem Maße auftrat. Es ist daher wahrscheinlich, daß die löslichen, sauren Peroxidase-Isoformen der Zellwand in hohem Maße an der Stabilisierung der Zellwände bzw. an der Synthese insektizider Verbindungen beteiligt sind.

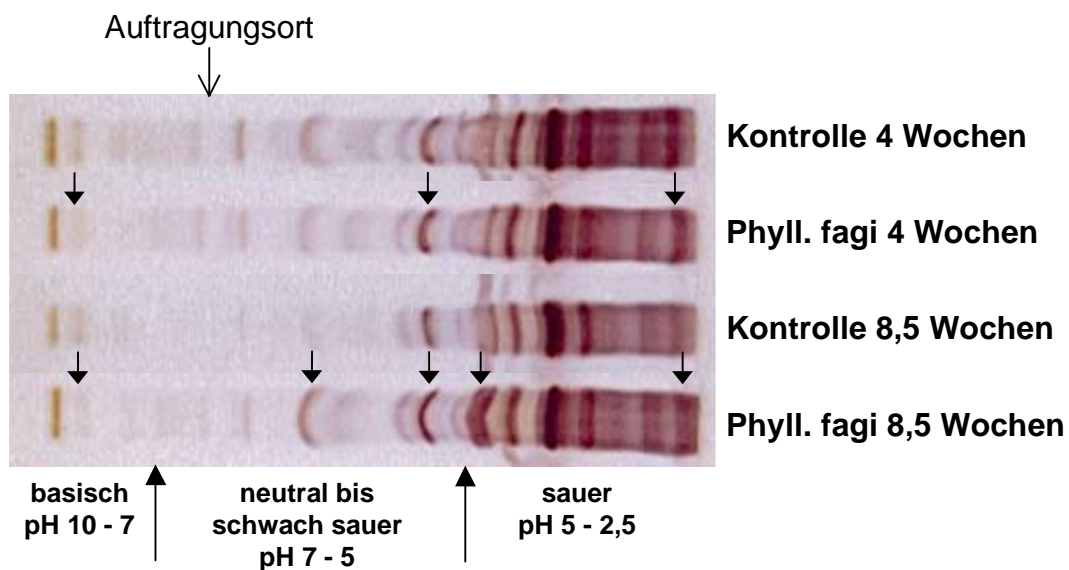


Abbildung 55: Bandenmuster der apoplastischen Peroxidaseproteine aus *Fagus sylvatica*-Blättern nach isoelektrischer Fokussierung auf Polyacrylamid-Gel und Färbung mit Guajacol und Benzidin. Einfluß des Befalls der Blätter mit *Phyllaphis fagi*. Die Veränderungen im Bandenmuster der befallenen Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen wurden mit Pfeilen gekennzeichnet.

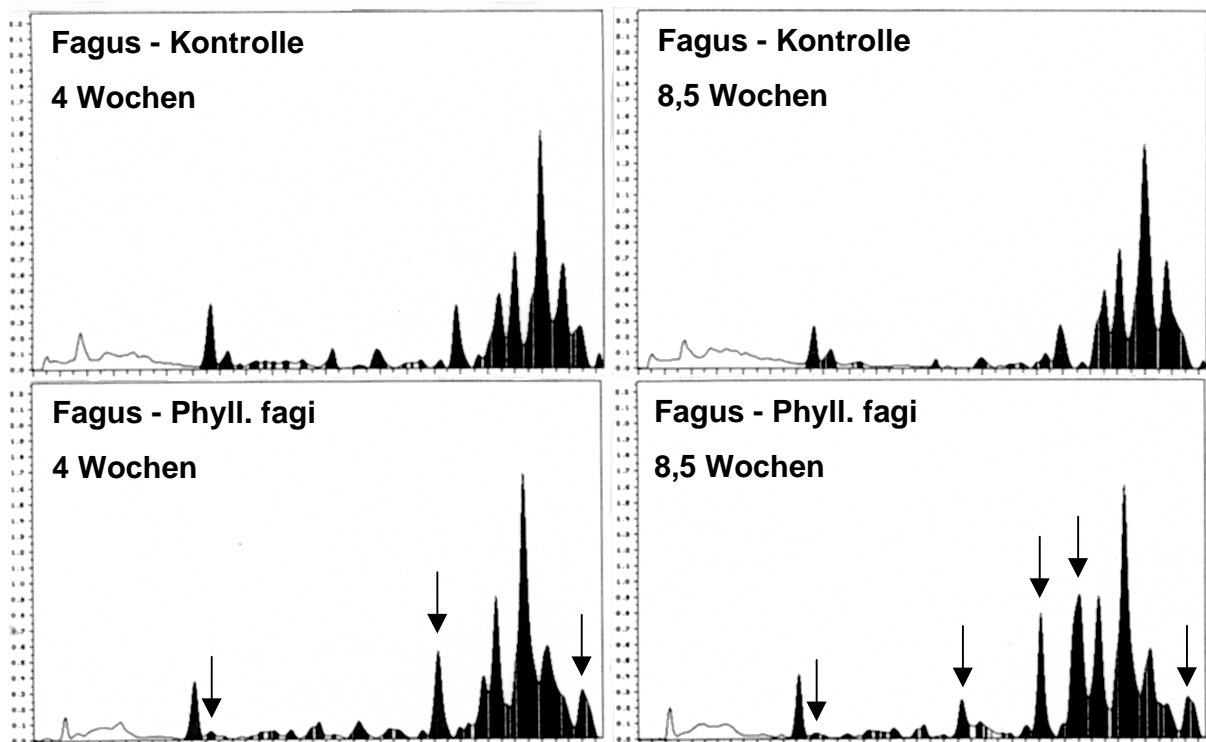


Abbildung 56: Densitogramme der in Abbildung 55 dargestellten Bandenmuster. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks entsprechen den in Abbildung 55 markierten Banden.

4.4.3 Einfluß von Trockenstreß auf Buchen-Jungpflanzen

Das Zusammenwirken geringer Bodenfeuchtigkeit und hoher Verdunstungsbelastung aufgrund niedriger Luftfeuchtigkeit und starker Sonneneinstrahlung in den Sommermonaten kann für Jungpflanzen rasch zu Wassermangel führen. In den mittleren und oberen Lagen des Osterzgebirges mit ihren skelettreichen Böden mit niedrigem Feinbodengehalt [NEBE et al., 1998] können sommerliche Trockenperioden für wenig geschützte Pflanzungen zu Trockenstreß-Situationen führen. In dieser Region kam es beispielsweise in der Vegetationsperiode 1997 nach einer etwa sechswöchigen, niederschlagsarmen Periode im Hochsommer selbst für Altbaum-Bestände zu einer angespannten Wasserhaushaltssituation, die bei Nadelbäumen zu einem frühzeitigen und starken Nadelfall im Herbst führte [ROTHE und ROLOFF, 1998]. Die Auswirkungen von Trockenstreß wurden deshalb in die Untersuchungen an den Buchen-Jungpflanzen einbezogen.

Im Versuchszeitraum herrschte eine vorwiegend trockene und sonnige Witterung mit Temperaturen bis etwa 30°C. Das hochsommerliche Wetter wurde lediglich von zwei kurzen, ein- bis zweitägigen, Regenperioden am Beginn und in der Mitte des Versuches unterbrochen. Aufgrund der Überdachung der Pflanzen beeinflussten die Regenereignisse jedoch nicht die Feuchtigkeit des Substrates in den Pflanzgefäßen.

Die Ausgangswerte der Bodenwassergehalte lagen bei allen Pflanzen zwischen rund 50 und 55%. Bereits nach zweiwöchigem Trockenstreß sank der Wassergehalt des Pflanzsubstrates im Mittel auf 42%. Am Ende des Versuches lag er bei rund 30% (vgl. Abbildung 58). Die Pflanzen zeigten gleichwohl nur geringe makroskopische Trockenstreß-Symptome. Erst

gegen Ende des Versuches war die für Buchen typische Aufkrümmung der Blattspreiten zu beobachten (Abbildung 57).



Abbildung 57: Leichte Aufkrümmung der Blattränder bei einer Versuchspflanze infolge von Trockenstreß

Dennoch konnte anhand der Chlorophyllgehalte und der Aktivitäten der apoplastischen Peroxidasen eine Streßreaktion der Pflanzen festgestellt werden.

Allerdings war eine deutliche Verringerung des Gesamtchlorophyll-Gehaltes lediglich mit erheblicher Verzögerung zum Absinken des Bodenwassergehaltes feststellbar. Erst bei der zweieinhalb Wochen nach der Wiederbewässerung der Pflanzen (9 Wochen nach Versuchsbeginn) durchgeführten Bestimmung des Pigmentgehaltes war der Unterschied zwischen den Kontrollen und den trockengestreßten Pflanzen signifikant (Tabelle 18).

Tabelle 18: Mittelwerte und Standardabweichungen der Blatt-Chlorophyllgehalte von trockengestreßten und von Kontroll-Pflanzen. (n = 10 bis 19). Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen nach Prüfung mit dem U-Test nach MANN und WHITNEY [1947].

	Chlorophyllgehalt [µg/ mg TM]		Signifikanz des Unterschiedes (Irrtumswahrscheinlichkeit p)
	K	TR	K - TR
Ausgangswert vor Versuchsbeginn	10,0 ± 1,9		-
6,5 Wochen nach Versuchsbeginn	9,6 ± 1,8	8,1 ± 2,1	0,06321
9 Wochen nach Versuchsbeginn (2,5 Wo. nach Wiederbewässerung)	12,0 ± 2,3	6,4 ± 2,5	0,00004

Wie die in der Tabelle 18 dargestellten Werte verdeutlichen, unterlagen auch die Chlorophyllgehalte der Kontrollen im Verlauf der Vegetationsperiode Schwankungen, eine eindeutig sinkende Tendenz wurde jedoch nur bei den trockengestreßten Pflanzen festgestellt. Allerdings wurde durch die kurzzeitige Streßsituation keine erkennbar beschleunigte Seneszenz der Blätter induziert. Die herbstliche Laubverfärbung trat bei den Pflanzen beider Versuchsgruppen im gleichen Zeitraum ein.

Hinsichtlich der Aktivität der Zellwand-Peroxidasen wurde eine wesentlich schnellere Reaktion auf die eingetretene Wassermangelsituation festgestellt. Die Enzymaktivität der trockengestreßten Pflanzen stieg im Verlauf des Versuches an und war bereits drei Wochen nach dem Beginn des Versuches signifikant höher als diejenige der Kontrollpflanzen. Am Ende des Versuches (nach 6,5 Wochen) waren die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen deutlich ausgeprägt und hochsignifikant (Abbildung 58 und Tabelle 19). Die niedrigere Peroxidaseaktivität der Kontrollen am Ende des Versuches darf bei der Beurteilung der Ergebnisse nicht unberücksichtigt bleiben. Ein Vergleich der Umsatzraten der Trockenstreß-Gruppe nach zwei Wochen Versuchsdauer und am Ende des Versuches zeigte jedoch auch innerhalb dieser Versuchsgruppe eine signifikante Erhöhung der Peroxidaseaktivität an (U-Test, Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$).

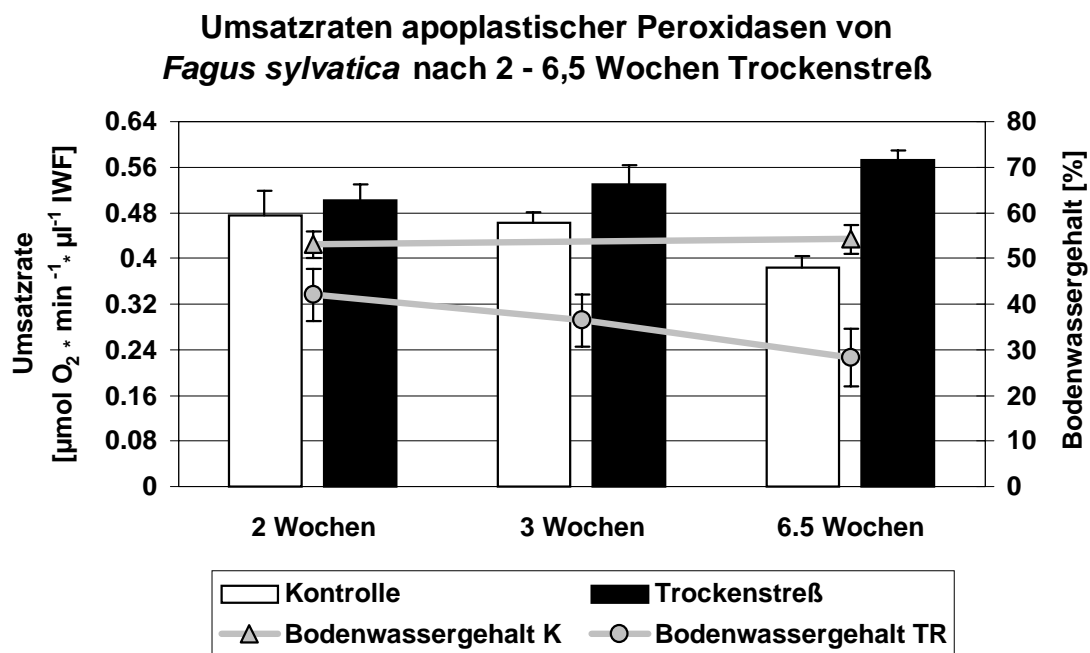


Abbildung 58: Aktivität apoplastischer Peroxidasen der Blätter von *Fagus sylvatica* und Wassergehalt des Pflanzsubstrates unter Trockenstreß (TR) und bei Kontrollpflanzen (K). Die Enzymaktivität wurde *in vitro* als Umsatzrate bei der Sulfitoxidation bestimmt. (Peroxidaseaktivität: $n = 6 - 8$; Bodenwassergehalt: $n = 10$)

Tabelle 19: Signifikanzniveaus der Unterschiede zwischen den angegebenen Gruppen nach Prüfung mit dem U-Test [MANN und WHITNEY, 1947]. Die Tabelle enthält die berechneten Irrtumswahrscheinlichkeiten.

Verglichene Gruppen	Irrtumswahrscheinlichkeit p
Kontrolle – Trockenstreß nach 2 Wochen	0,2482
Kontrolle – Trockenstreß nach 3 Wochen	0,0011
Kontrolle – Trockenstreß nach 6,5 Wochen	0,0007
Trockenstreß nach 2 und 6,5 Wochen	0,0066

Die Peroxidaseaktivität der trockengestreßten Pflanzen blieb auch nach dem Ende des Versuches erhöht. Noch zweieinhalb Wochen nachdem die Pflanzen wieder regelmäßig bewässert wurden lagen die Umsatzraten im Mittel um 12% über denjenigen der Kontrollen. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war signifikant (U-Test, $p < 0,05$, Daten nicht dargestellt).

Das Auftreten einer Wassermangelsituation induziert bei den Pflanzen eine Reihe verschiedener systemischer Reaktionen. Die unausgeglichene Wasserbilanz führt rasch zu einer Verringerung der Spaltöffnungsweite, die nach bisherigen Erkenntnissen vordergründig durch einen Anstieg der Abscisinsäurekonzentration in den Blättern bedingt ist [HARTUNG et al., 1988; LOEWENSTEIN und PALLARDY, 1998]. Eine Beteiligung von Ca^{2+} -Ionen an den Signalübertragungswegen, die zum Verschluß der Spaltöffnungen führen, wurde ebenfalls diskutiert [FRANDSEN et al., 1996; RIDOLFI et al., 1996]. Die verringerte Spaltöffnungsweite führt zur Einschränkung der Transpiration, limitiert jedoch gleichzeitig den CO_2 -Influx. Es kommt zu einer verminderten Photosyntheseleistung der Blätter [SMIRNOFF, 1993; GIARDI et al., 1997]. Abhängig vom zeitlichen Verlauf und von der Intensität des Trockenstress sowie den Strahlungsverhältnissen werden weitere Schädigungsmechanismen induziert. Diese sind unter anderem durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die direkte Beeinträchtigung des Photosyntheseapparates, eine Störung der Membranintegrität bis hin zu ultrastrukturellen Veränderungen der Chloroplasten, oder durch rasche Inhibierung von Enzymen gekennzeichnet [SMIRNOFF, 1993; LOPEZ-CARBONELL et al., 1994, HAO et al., 1996]. Es kommt zu Umverteilungen von Kohlenhydraten und Aminosäuren innerhalb der Pflanze [AMUNDSON et al., 1993; GUEHL et al., 1993; ŠIRCELJ, et al., 1999].

Im Hinblick auf den in der vorliegenden Untersuchung festgestellten Chlorophyllabbau müssen die Vorgänge in den Chloroplasten näher betrachtet werden. Die Verringerung der CO_2 -Zufuhr führt, insbesondere bei hohen Quantenflüssen, durch Herausbildung eines Ungleichgewichtes zwischen der Lichtreaktion und den CO_2 -fixierenden Prozessen zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, die eine Schädigung der Membransysteme hervorrufen [KRONFUSS et al., 1998; BOO und JUNG, 1999, DAT et al., 2000]. Die enge Einbindung der Pigmentmoleküle in die Membransysteme wird damit gestört und vermutlich

werden die Pigmente hierdurch auch für katabole Enzyme zugänglich gemacht. Über eine Dissoziation der Lichtsammelkomplexe (LHC II) und einen verstärkten Abbau des D1- und des CP43-Proteins im Photosystem II wird ebenfalls im Zusammenhang mit Trockenstreß berichtet [HAO et al., 1996; GIARDI et al., 1997]. Dies trägt zur weiteren Schädigung des Photosyntheseapparates bei. Die unter Trockenstreß in erhöhter Konzentration in den Blättern vorhandene Abscisinsäure kann gleichfalls in den Prozeß des Chlorophyllabbaus eingreifen. Das Phytohormon kann die Aktivität der Phaeophorbid a - Oxygenase erhöhen. Dieses Enzym katalysiert eine der beiden Reaktionen, die während des Abbauprozesses zur Aufspaltung des Porphyrin-Ringes der Chlorophyllmoleküle führen [RODONI et al., 1998; HÖRTENSTEINER, 1999].

Die Tatsache, daß im Rahmen dieser Untersuchung erst nach mehreren Wochen ein deutlicher Chlorophyllabbau festzustellen war, spricht dafür, daß die Pflanzen zunächst in der Lage waren, die Streßsituation zu bewältigen. Eine langsam verlaufende Austrocknung des gut wasserspeichernden Pflanzsubstrates trug sicherlich dazu bei, stabilisierende und reparative Prozesse wirksam werden zu lassen. Die zahlreichen Komponenten des antioxidativen Systems spielen bei diesen Gegenreaktionen unter Trockenstreß eine wichtige Rolle [SMIRNOFF, 1993; KRONFUSS et al., 1998; ZHANG und SCHMIDT, 1999]. Auch die Stimulierung der Peroxidasen der Zellwand ist vermutlich in diesem Kontext zu sehen. Es ist anzunehmen, daß auch in diesem Falle, den Reaktionen nach Blattverwundung oder Blattlausbefall vergleichbar, der Anstieg der Konzentration aktiver Sauerstoffspezies in den Geweben und die damit verbundenen Folgereaktionen eine Signalwirkung auf die Peroxidasen der Zellwand hatten.

Eine weitere Ursache für die erhöhte Aktivität der Zellwand-Peroxidasen könnte deren Stimulierung durch erhöhte Abscisinsäure-Konzentrationen im Apoplasten sein. Dies wurde von THOMPSON et al. [1997] nach Untersuchungen an *Lolium tremulentum* L. vermutet, bei denen ebenfalls eine Erhöhung der Aktivität der Zellwand-Peroxidasen unter Wassermangel festgestellt wurde. Die Erhöhung der Abscisinsäure-Konzentration in der Zellwand-Phase ist durch das Absinken des pH-Wertes der Zellwand unter Trockenstreß und die damit verbundenen Umverteilung dieses Phytohormones zwischen dem Cytoplasma und der Zellwandphase bedingt [HARTUNG et al., 1988].

Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung der in der IWF enthaltenen Proteine konnte gezeigt werden, daß durch die Trockenstreß-Situation mehrere Peroxidase-Isoformen stimuliert wurden. In der Abbildung 59 sind die Bandenmuster der Peroxidase-Isoformen zwei Wochen nach Beginn und am Ende des Versuches dargestellt. Die entsprechenden Densitogramme sind in Abbildung 60 wiedergegeben. Die Peroxidase-Isoformen die neu oder deutlich verstärkt auftraten, sind in beiden Abbildungen durch Pfeile gekennzeichnet.

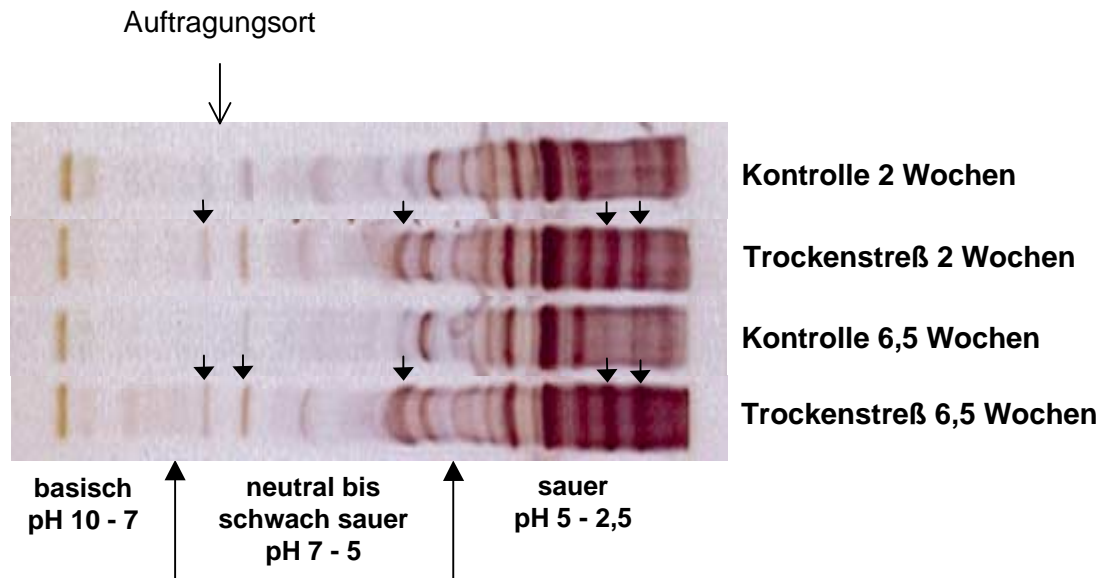


Abbildung 59: Vergleich der Bandenmuster apoplastischer Peroxidasen von trockengestreßten und nach Bedarf gewässerten Pflanzen nach 2 und 6,5 Wochen.

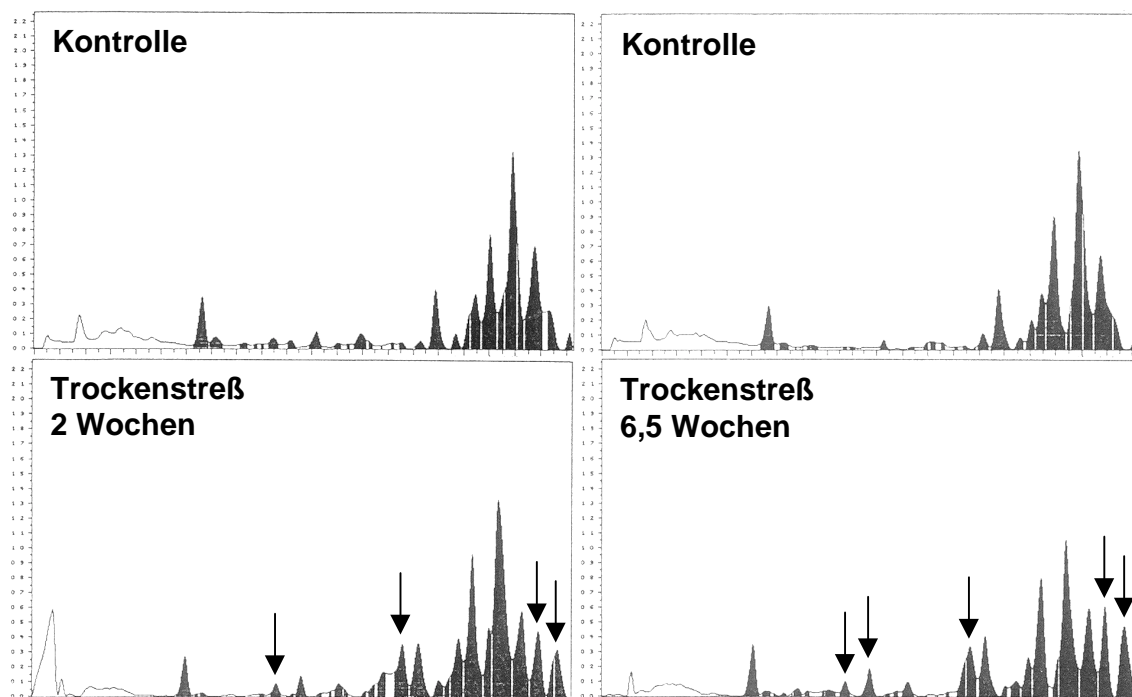


Abbildung 60: Densitogramme der in Abbildung 59 dargestellten Bandenmuster. Die mit Pfeilen markierten Peaks entsprechen den in der Abbildung 59 durch Pfeile hervorgehobenen Banden.

Wie die beiden Abbildungen verdeutlichen, wurden sowohl Enzym-Isoformen deren pI im stark sauren, als auch im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich lagen durch die Streßsituation induziert. Im stark sauren Bereich waren die Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollen jedoch am deutlichsten ausgeprägt. Auch die im aufgetragenen IWF-Volumen enthaltene Gesamtaktivität war bei den gestreßten Pflanzen im sauren pH-

Bereich höher. Diesen hohen Peroxidase-Aktivitäten standen unter Trockenstreß verringerte Proteingehalte in den IWF-Proben gegenüber. Der niedrigste Proteingehalt wurde nach 6,5 Wochen Trockenstreß festgestellt (Tabelle 20). Dies ist in Verbindung mit den Ergebnissen der isoelektrischen Fokussierung ein Hinweis darauf, daß der Gehalt und die Aktivität der Peroxidasen im Apoplasten selektiv erhöht wurden, während der Gehalt an anderen Proteinen unter Wassermangel vermindert wurde. Aus den bereits diskutierten Gründen liefern die gewonnenen Daten jedoch nur Anhaltspunkte (vgl. Kap. 4.1.3.2).

Tabelle 20: Proteingehalte in den IWF-Proben von *Fagus sylvatica* unter Trockenstreß im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen.

Trockenstreß-Dauer	Proteingehalt der IWF [$\mu\text{g} / \text{ml}$]	
	Trockenstreß	Kontrolle
2 Wochen	134,5	173,2
3 Wochen	163,3	231,1
6,5 Wochen	104,0	246,3

Die Aktivität der apoplastischen Peroxidasen trat unter den im Versuch herbeigeführten Trockenstreß-Bedingungen als Frühindikator in Erscheinung, da bereits nach verhältnismäßig kurzer Zeit signifikante Unterschiede zur Kontroll-Gruppe festgestellt werden konnten, ohne daß zu diesem Zeitpunkt äußerliche Trockenstreß-Symptome erkennbar waren.

Welche Enzym-Isoformen bei bestimmten Abwehrreaktionen stimuliert werden, scheint zum einen von der jeweiligen Pflanzenart abhängig zu sein [DOWD, 1994]. Andererseits scheinen aber auch verschiedene Stressoren innerhalb einer Art verschiedene Peroxidase-Isoformen zu stimulieren. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten zwar, daß überwiegend saure Peroxidasen durch die Streßereignisse stimuliert wurden, bei einem direkten Vergleich der Bandenmuster nach isoelektrischer Fokussierung war jedoch erkennbar, daß die induzierten Enzym-Isoformen nicht identisch waren (Abbildung 61).

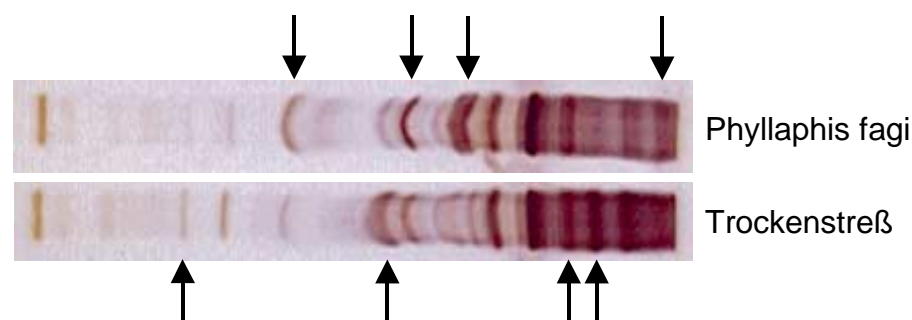


Abbildung 61: Vergleich der Bandenmuster apoplastischer Peroxidasen von *Fagus sylvatica* bei Befall der Pflanzen mit *Phyllaphis fagi* (nach 8,5 Wochen) und unter Trockenstreß (nach 6,5 Wochen). Die Pfeile kennzeichnen die im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen verstärkt aufgetretenen Isoformen (vgl. Abbildung 55 und Abbildung 59). Die Proben wurden im gleichen Zeitraum gewonnen (Mitte August) und beide Proben wurden im gleichen Gel aufgetrennt.

Grundsätzlich sprechen diese Ergebnisse für die intensive Beteiligung saurer Peroxidasen an der Streßabwehr und bestätigen, daß deren generell hohe Konzentration in der Zellwand wahrscheinlich tatsächlich mit ihrer Schutzfunktion in Zusammenhang steht. Offensichtlich werden jedoch durch die verschiedenen Stressoren trotz der, nach bisherigen Erkenntnissen, großen Ähnlichkeiten der streßphysiologischen Abläufe, verschiedene Signalübertragungswege mit unterschiedlicher Intensität ausgelöst.

Die Modulationen, denen die Grundmuster dieser Abläufe in Anpassung an die jeweilige Situation unterliegen und die eine differenzierte Streßantwort ermöglichen, müssen jedoch Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Die Erkenntnisse über die zahlreichen Wege die innerhalb einer Pflanze bei der Signalübertragung nach Streßereignissen beschritten werden und insbesondere deren komplexe gegenseitige Beeinflussung sowie ihre genaue zeitliche Abfolge sind bisher nur lückenhaft.

4.4.4 Zusammenfassung

Alle drei untersuchten Streßfaktoren führten zu einer Steigerung der Peroxidaseaktivität.

Es konnte mit diesen Untersuchungen jedoch gezeigt werden, daß die Pflanzen sehr differenziert auf die jeweilige Situation reagierten. Je nach Art und Verlauf des Streßereignisses wurden die Enzyme unterschiedlich schnell aktiviert. Eine akute Schädigung der Blätter, wie dies bei Blattverwundung der Fall war, führte innerhalb von 48 h zu einer signifikanten Erhöhung der Peroxidaseaktivität. Nach zwei bis drei Wochen war die Streßreaktion beendet. Dagegen führte eine sich über einen längeren Zeitraum aufbauende Streßsituation, wie dies bei einer Unterbrechung der Bewässerung der Fall ist, zu einem langsamen Anstieg der Peroxidaseaktivität, so daß erst nach drei Wochen signifikant erhöhte Umsatzraten gemessen wurden.

Die Ergebnisse zeigten, daß an den Reaktionen auf die verschiedenen Streßereignisse überwiegend saure Peroxidase-Isoformen beteiligt waren. Es wird angenommen, daß deren Funktionen vordergründig mit der Kontrolle der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies und mit der Festigung der Zellwand in Zusammenhang stand. Ein Vergleich der Bandenmuster, die nach der isoelektrischen Fokussierung der Peroxidaseproteine erhalten wurden, zeigte, daß bei verschiedenen Streß-Arten verschiedene Enzym-Isoformen aktiviert wurden. Dies verdeutlicht das Vermögen der Pflanzen, ihre Abwehrstrategie spezifisch an die jeweilige Situation anzupassen.

Im Hinblick auf Untersuchungen zum Verhalten der Zellwand-Peroxidasen unter Belastung mit Luftschadstoffen muß festgehalten werden, daß ein vorausgegangenes oder zeitgleiches Auftreten der hier untersuchten Streßfaktoren so erhebliche Auswirkungen auf die Peroxidaseaktivität hat, daß es zu einer Überlagerung der Effekte kommen kann.

5 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Die für den ökologisch orientierten Waldumbau im Osterzgebirge bedeutsamen Baumarten *Fagus sylvatica*, *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* wurden einer Langzeitbelastung mit Schwefeldioxid oder einer Mischung aus Schwefeldioxid und Ozon ausgesetzt und deren Streßreaktionen sowohl makroskopisch und mikroskopisch als auch mit biochemisch-physiologischen Arbeitsmethoden untersucht.

Am Beispiel von *Fagus sylvatica* wurden ergänzend die Auswirkungen von Blattverwundung, Blattlaus-Befall und Trockenheit betrachtet.

Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag bei den bisher nur in wenigen Studien erforschten Prozessen im Blatt-Apoplasten. Hierbei wurde das Hauptaugenmerk auf die extrazellulären Peroxidasen gerichtet, da diese Enzyme das Potential besitzen, verschiedene an der Streßabwehr beteiligte Reaktionen zu katalysieren, und in der Zellwandphase in hohen Konzentrationen vorkommen.

Im Rahmen der Untersuchungen gelang es, lösliche Zellwand-Peroxidasen aus den Blättern der drei Laubbaumarten mit Hilfe einer Infiltrations- und Zentrifugationstechnik herauszuwaschen und deren Sulfit- und IAA-Oxidationsaktivität *in vitro* unter optimierten Bedingungen zu messen. Aufgrund dieser Möglichkeiten konnten die Zellwand-Peroxidasen näher charakterisiert und Aussagen über ihre mögliche Funktion unter den applizierten Streßbedingungen abgeleitet werden.

Die herausgelösten apoplastischen Peroxidasen waren verhältnismäßig temperaturstabile, vorwiegend saure Enzym-Isoformen, die vermutlich calciumvermittelt sekretiert wurden und/oder durch Calcium aktivierbar waren. Die optimalen Substratkonzentrationen für *in vitro*-Messungen waren bei allen untersuchten Baumarten weitgehend ähnlich.

Die Peroxidasen traten im *in vitro*-Versuch in Wechselwirkung mit Ascorbat. Dieses hemmte die Sulfitoxidationsreaktion reversibel. Dies weist einerseits darauf hin, daß bei der *in vitro*-Sulfitoxidation tatsächlich radikalische Intermediate gebildet wurden, mit denen das Ascorbat reagierte. Andererseits bestätigt dieses Ergebnis, daß in den Apoplasten sekretiertes Ascorbat regulatorisch in die Reaktionen der Zellwand-Peroxidasen eingreifen kann.

Die pH-Optima der Sulfit- und der IAA-Oxidationsreaktionen unterschieden sich mit pH 7,8 und pH 4,0 sehr deutlich, so daß ein gleichzeitiges Ablaufen beider Reaktionen in der selben Zellwand-Region nur bei Vorhandensein von Mikroporen mit stark unterschiedlichen Milieubedingungen möglich erscheint. Die Verifizierung dieser Annahme bedarf jedoch weiterführender *in vivo* - Untersuchungen der Zellwand.

Im Immissionsstreß-Versuch bildeten sich unter dem Einfluß der Luftschadstoffe Chlorosen und Nekrosen auf den Blättern der Versuchspflanzen heraus. Letztere traten bei *Betula* und *Sorbus* vor allem bei Belastung mit der Schadstoffkombination auf. Besonders typisch waren hierbei kleinflächige, rotbraune Nekrosen auf der Oberseite der Birkenblätter.

Der Chlorophyllgehalt der Blätter sank deutlich ab. Teilweise, insbesondere im zweiten Probenahme-Jahr, enthielten die Blätter nur noch 30 – 50% des Chlorophyllgehaltes der Kontrollen. Ein „Memory-Effekt“ war hierbei vor allem bei *Betula* erkennbar, da die Blätter dieser Baumart im zweiten Probenahme-Jahr bereits wesentlich zeitiger deutlich verminderte Pigmentgehalte hatten als im Vorjahr. Ein späterer Austrieb der Knospen der begasten Pflanzen im Frühjahr weist ebenfalls auf einen derartigen Effekt hin.

Bei *Betula* wurde zudem ein frühzeitiger Laubfall beobachtet. Dies kann bei ausreichend ernährten Pflanzen aufgrund der damit verbundenen erhöhten Blatterneuerungs-Rate zur Schadstoffentlastung beitragen.

Die Blattflächen und die Interzellularraum-Volumina waren unter Schadstoffbelastung kleiner als bei den Kontroll-Pflanzen. Möglicherweise zeigte sich hierin eine Tendenz zur Verringerung der Kontaktfläche mit den gasförmigen Schadstoffen. Auch die gesamte Wuchsleistung der Pflanzen wurde beeinträchtigt. Am Ende des Versuches wiesen die begasten Pflanzen sowohl geringere Wuchshöhen als auch geringere Frischmassen als die entsprechenden Kontrollen auf (diese Parameter wurden nur bei *Betula* und *Sorbus* untersucht). Dennoch zeigten auch die gestreßten Pflanzen einen Zuwachs, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die verhältnismäßig hohe Schadstoffbelastung auch längerfristig nicht zwangsläufig zum Ausfall der Pflanzen geführt hätte.

Bei allen genannten Parametern wurde häufig ein stärkerer Effekt der Schadstoffkombination im Vergleich zur Belastung mit SO₂ allein beobachtet. Die Unterschiede waren jedoch weit weniger deutlich, als diejenigen zu den entsprechenden Kontrollen.

Die Schadstoffbelastung führte bei allen drei Baumarten zu Veränderungen in den Elementgehalten der Blätter. Bei allen drei Baumarten wurden unter Belastung mit SO₂ deutlich erhöhte S-Gehalte festgestellt, während bei den mit SO₂ und Ozon behandelten Pflanzen nur in wenigen Fällen ein Zusammenhang zwischen der Schadstoffeinwirkung und dem S-Gehalt der Blätter beobachtet wurde. Hierfür war möglicherweise ein verstärkter Spaltöffnungsschluß unter Einwirkung der Schadstoffkombination verantwortlich. Die Messung der Calcium-, Kalium- und Magnesiumgehalte machten neben den Auswirkungen der Schadstoffbelastung vor allem Unterschiede zwischen den beiden Pionierbaumarten *Betula pendula* und *Sorbus aucuparia* und der Klimax-Baumart *Fagus sylvatica* deutlich. Dies kann als Hinweis auf ein unterschiedliches Nährstoffaufnahmevermögen, bzw. auf unterschiedliche Strategien bei Transport und Speicherung der Nährstoffe gesehen werden und steht vermutlich im Zusammenhang mit den geringen Ansprüchen der Pionierbaumarten an den Nährstoffgehalt des Bodens.

Bei der Messung der IAA- und Sulfitoxidationsraten der Zellwand-Peroxidasen wurden große Ähnlichkeiten hinsichtlich des jahreszeitlichen Verlaufs der beiden Aktivitäten und der Intensität der Reaktionen festgestellt. Es kann vermutet werden, daß beide Umsetzungen von den selben Enzymen katalysiert werden. In diesem Zusammenhang müßte genauer untersucht werden, ob die unterschiedlichen Enzymaktivitäten durch Konformationsänderungen der Peroxidasemoleküle bei Reaktion mit den phenolischen Cosubstraten und bei unterschiedlichen pH-Werten bedingt sind. Die Möglichkeit des Vorhandenseins ähnlich regulierter Enzym-Isoformen muß jedoch ebenfalls in Betracht gezogen werden und sollte in der Zukunft durch ausführliche Untersuchungen der Substratspezifitäten aufgetrennter Peroxidase-Isoformen anhand von verschiedenen Aktivitätsfärbungen nachgeprüft werden.

Die Untersuchung der apoplastischen Peroxidasen unter dem Einfluß von SO₂ und dem SO₂-Ozon-Gemisch machte große Unterschiede zwischen den drei Baumarten deutlich, die sowohl auf verschiedenartige Streßbewältigungsmechanismen, als auch auf eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber den Luftschadstoffen schließen lassen.

Bei *Fagus sylvatica* wurde im Rahmen der vorliegenden Langzeitstudie unter Schadstoffeinfluß eine Verlagerung des ausgeprägt jahreszeitlich bestimmten Verlaufs der Peroxidaseaktivität um etwa einen Monat nach vorn festgestellt. Die Höhe der enzymatischen Umsatzraten änderte sich insgesamt nicht. Eine verfrüht einsetzende Seneszenz der Blätter

aufgrund der Schädigung durch die Luftschadstoffe kann als Ursache für die zeitliche Verschiebung angenommen werden.

Die Untersuchungen an *Betula pendula* ergaben dagegen unter Einwirkung von SO₂ und Ozon eine Steigerung der Peroxidaseaktivität in der zweiten Hälfte der Vegetationsperiode.

Dieser Effekt der Schadstoffkombination läßt auf eine Signalwirkung oxidativer Prozesse in der Zellwand selbst und an der Plasmamembran schließen. Neben der Stimulation von Reaktionen, die die Konzentration aktivierter Sauerstoffspezies in der Zellwand regulieren, ist wahrscheinlich auch ein intensivierter IAA-Abbau in den Blättern eine Folge derartiger Signale. Dies könnte in Zusammenhang mit der erhöhten Blatterneuerungs-Rate von *Betula pendula* unter Belastung mit der Schadstoffkombination stehen, da der Abbau dieses Phytohormones Voraussetzung für eine Blattabszission ist.

Bei *Sorbus aucuparia* wurde eine verminderte Aktivität der Zellwand-Peroxidasen bei Belastung mit Luftschadstoffen festgestellt. Es wird vermutet, daß diese Baumart besonders sensitiv auf die kontinuierliche Schadstoffimmission reagierte, so daß ein Erschöpfungszustand eintrat, der mit einer verminderten Neusynthese der Enzyme bzw. mit einem erhöhten Proteinabbau verbunden war.

Mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung der Peroxidaseproteine konnte gezeigt werden, daß unter Schadstoffeinwirkung bei keiner Baumart eine Veränderung der Anzahl isolierbarer Enzym-Isoformen eintrat. Die Intensität der Färbung der Banden unterstützte jedoch weitgehend die aus den Messungen der enzymatischen Umsatzraten gezogenen Schlußfolgerungen.

Die Ausgangsüberlegung, daß die Zellwand-Peroxidasen bei Luftschadstoffbelastung als Frühindikatoren fungieren können und mit einer raschen Abwehr von Schwefeldioxid oder Ozon in Zusammenhang stehen, konnte anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse für die drei Laubbaumarten nicht bestätigt werden. Es wurde jedoch deutlich, daß große artspezifische Unterschiede in der Reaktion auf die Luftschadstoffe bestanden, die eine unterschiedliche Schadstofftoleranz und unterschiedliche Strategien bei der Streßbewältigung aufzeigen.

Die Erkenntnisse zur Wirkung von Luftschadstoffen konnten für die Baumart *Fagus sylvatica* um Befunde über die Folgen von Trockenheit, Blattverwundung und Blattlausbefall ergänzt werden.

Es konnte festgestellt werden, daß die Pflanzen sehr differenziert auf die unterschiedlich rasch und mit unterschiedlicher Intensität einsetzenden Streßsituationen zu reagieren vermochten.

Die Verwundung der Blätter zog binnen 48 h einen intensiven Anstieg der Peroxidaseaktivität nach sich. Dagegen führte eine sich langsam aufbauende Belastungssituation, wie dies im Trockenstreßversuch der Fall war, erst nach 3 Wochen zu einer signifikanten Erhöhung der Peroxidaseaktivität im Blatt-Apoplasten. Auch der Befall der Blätter mit *Phyllaphis fagi* führte zu einem signifikanten Anstieg der Peroxidaseaktivität, hier können jedoch keine Aussagen über kurzfristige Veränderungen getroffen werden, da die erste Probenahme erst nach weitgehender Ausbreitung der Insekten über die Mehrzahl der Versuchspflanzen stattfinden konnte. Zu diesem Zeitpunkt, nach 4 Wochen Versuchsdauer, wurden jedoch bereits signifikante Unterschiede zwischen den befallenen Pflanzen und den Kontrollen festgestellt.

Die Auftrennung der Peroxidase-Isoformen mittels isoelektrischer Fokussierung auf Polyacrylamid-Gelen zeigte, daß sowohl unter abiotischem als auch unter biotischem Streß vordergründig saure Enzym-Isoformen stimuliert wurden. Dies steht vermutlich mit der

Ähnlichkeit der grundlegenden physiologischen Abläufe unter dem Einfluß verschiedener Streßfaktoren in Zusammenhang.

Generell ist davon auszugehen, daß eine Schädigung der Zellwand und der Plasmamembran als Auslöser für die meisten zellulären Streßreaktionen angesehen werden muß. Von diesen beiden Strukturen gehen die meisten Signale aus, die die verschiedenen Abwehrmechanismen in Gang setzen. In der Regel sind reaktive Sauerstoffspezies an der Signalvermittlung beteiligt. Diese entstehen teilweise aufgrund der Reaktion von Schadstoffen mit Zellwand- und Plasmamembran-Komponenten, teilweise können sie jedoch auch in Folge eines Streßereignisses als Signalsubstanzen von den Pflanzen selbst produziert werden. Die Grundprinzipien, denen die Reaktionen auf verschiedene Streß-Arten unterliegen, weisen demnach große Ähnlichkeiten auf. Die dennoch offenkundig deutlich differenzierten Streßantworten der Pflanzen liegen vermutlich in der Abstimmung der einzelnen Abläufe aufeinander begründet. Hierbei scheint sowohl die zeitliche Abfolge als auch die Regulation der Intensität der verschiedenen Reaktionen eine Rolle zu spielen. Das Verständnis für diese individuellen Steuerungsmechanismen ist derzeit jedoch noch lückenhaft und muß künftig stärkere Beachtung erfahren.

6 Literaturverzeichnis

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. (1990): Molekularbiologie der Zelle. 2. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

AMUNDSON, R.G.; KOHUT, R.J.; LAURENCE, J.A.; FELLOWS, S.; COLAVITO, L.J. (1993): Moderate water stress alters carbohydrate content and cold tolerance of red spruce foliage. Environ. Exp. Bot. 33 (3), S. 383-390

APPEL, H.M. (1993): Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. J. Chem. Ecol. 19, S. 1521-1552

AREND, M. (1997): Untersuchungen zum Verhalten apoplastidärer Peroxidasen in den Blättern von *Fagus sylvatica* L. unter besonderer Berücksichtigung von Immissions- und Trockenstreß. Diplomarbeit, TU Dresden, Institut für Forstbotanik und Forstzoologie

ARNON, D.J. (1949): Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidasen in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24, S. 1-15

BÄUCKER, B. (2000): Schäden an Sand-Birken in den höheren Lagen des Erzgebirges. Tagungsband zum „Sandbirken-Symposium“, 4.5.2000, Tharandt

BERGMANN, W. (1993): Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen. Entstehung, visuelle und analytische Diagnose. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart

BERGMANN, E.; BENDER, J.; WEIGEL, H.-J. (1999): Ozone threshold doses and exposure-response relationships for the development of ozone injury symptoms in wild plant species. New Phytol. 144, S. 423-435

BISSWANGER, H. (1994): Enzymkinetik: Theorie und Methoden. 2. Aufl., VCH Weinheim

BOEUF, G.; LEGRAND, B.; RAMBOUR, S. (1999): Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. Physiol. Plant. 106, S. 331-336

BOO, Y.C.; JUNG, J. (1999): Water deficit - induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. J. Plant Physiol. 155, S. 255-261

BOUDET, A.M.; LAPIERRE, C.; GRIMA-PETTENATI, J. (1995): Tansley Review No. 80. Biochemistry and molecular biology of lignification. New Phytol. 129, S. 203-236

BOYER, N.; DE JAEGER (1986): Direct or indirect role of peroxidases in ethylene biosynthesis? In GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPARD, T. (eds.): Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva, Switzerland, S. 47-60

BRADFORD, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, S. 248-254

BRETT, C.; WALDRON, K. (1996): Physiology and biochemistry of plant cell walls. In: BLACK, M.; CHARLWOOD, B. (series eds.): *Topics in plant functional biology*: 1 Second edition; Chapman & Hall, London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras

BUCHER, J.B. (1981): SO₂-induced ethylene evolution of forest tree foliage and its potential use as stress-indicator. *Eur. J. For. Path.* 11, S. 369-373

BUNGENER, P.; BALLS, G.R.; NUSSBAUM, S.; GEISSMANN, M.; GRUB, A.; FUHRER, J. (1999): Leaf injury characteristics of grassland species exposed to ozone in relation to soil moisture condition and vapour pressure deficit. *New Phytol.* 142, S. 271-282

BURSCHEL, P. ; VITE, J.P. (1951): Neue Beobachtungen über die Buchenbaumblattlaus. *Forstw. Centralbl.* 70, S. 181-185

CARPIN, S.; CRÉVECOEUR, M.; GREPPIN, H.; PENEL, C. (1999): Molecular cloning and tissue specific expression of an anionic peroxidase in zucchini. *Plant Physiol.* 120 (3), S. 799-810

CASTILLO, F.J. (1986): Extracellular peroxidases as markers of stress? In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, TH. (eds.): *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. University of Geneva, Switzerland, S. 419-426

CASTILLO, F.J. (1992): Peroxidases and stress. In: PENEL, C.M.; GASPAR, T.; GREPPIN, H. (eds.): *Plant peroxidases. Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects*. University of Geneva, Switzerland, S. 187-203.

CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H. (1986): Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *Sedum album* leaves after ozone exposure. Analysis by high-performance liquid chromatography. *Physiol. Plant.* 68, S. 201-208

CASTILLO, F.J.; HEATH, R.L. (1990): Ca²⁺ Transport in membrane vesicles from pinto bean leaves and its alteration after ozone exposure. *Plant Physiol.* 94, S. 788-795

CASTILLO, F.J.; PENEL, C.; GREPPIN, H. (1984a): Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves. Involvement of Ca²⁺. *Plant Physiol.* 74, S. 846-851

CASTILLO, F.J.; CELARDIN, F.; GREPPIN, H. (1984b): Peroxidase assay in plants: Interference by ascorbic acid and endogenous inhibitors in *Sedum* and *Pelargonium* enzyme extracts. *Plant Growth Regulation* 2, S. 69-75

CASTILLO, F.J.; MILLER, P.R.; GREPPIN, H. (1987): Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. "Waldsterben", Part IV (continuing series). *Experientia* 43, S. 111-115

CHAMEIDES, W.L. (1989): The chemistry of ozone deposition to plant leaves: Role of ascorbic acid. *Environ. Sci. Technol.* 23 (5), S. 595–600

CIPOLLINI JR.; D.F. (1998): The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. *Am. J. Bot.* 85 (11), S. 1586-1591

CROWDY, S.H.; TANTON, T.W. (1970): Water pathways in higher plants. I. Free space in wheat leaves. *J. Exp. Bot.* 21, S. 102–111

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.; VAN BREUSEGEM, F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Review. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 57, S. 779-795

DAVIES, E. (1987): Plant responses to wounding. *The Biochemistry of Plants* 12, S. 243-264

DECEDUE, C.J.; BORCHERT, R. (1980): Potato peroxidase isozymes. *Plant Physiol.* 65 (suppl.): S. 29

DELIEU, T.; WALKER, D.A. (1972): An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol.* 71, S. 201 – 225

DIEHN, S.H.; BURKHART, W.; GRAHAM, J.S. (1993): Purification and partial amino acid sequence of a wound-inducible, developmentally regulated anionic peroxidase from soybean leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195 (2), S. 928-934

DOWD, P.F. (1994): Enhanced maize (*Zea mays* L.) pericarp browning: associations with insect resistance and involvement of oxidizing enzymes. *J. Chem. Ecol.* 20 (11), S. 2777-2803

DOWD, P.F.; LAGRIMINI, L.M. (1997): The role of peroxidase in host insect defenses. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M.: *Advances in insect control: The role of transgenic plants*. Taylor & Francis Ltd., London, S. 195-223

DOWD, P.F.; LAGRIMINI, L.M.; HERMS, D.A. (1998): Differential leaf resistance to insects of transgenic sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) expressing tobacco anionic peroxidase. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 54, S. 712-720

DUNFORD, H.B. (1991): Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.E.; GRISHAM, M.B. (eds.): *Peroxidases in chemistry and biology*. CRC Press, Boca Raton, S. 1-23

ELKIEY, T.; ORMROD, D.P. (1981): Absorption of ozone, sulphur dioxide, and nitrogen dioxide by petunia plants. *Environ. Exp. Bot.* 21, S. 63-70

ELLENBERG, H. (1995): Neuartige Waldschäden. Ökologische Kritik an den Untersuchungsmethoden. *AFZ* 15, S.1-2

ELLING, W. (1992): Waldschäden und Waldschadensforschung. Eine kritische Zwischenbilanz. Naturwissenschaftliche Rundschau 45 (5), S. 184-189

ELSTNER, E.F.; HIPPELI, S. (1995): Schadstoffe aus der Luft. In: HOCK, B.; ELSTNER, E.F. (Hrsg.): Schadwirkungen auf Pflanzen. 3. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 79-117

FELLE, H.H.; BERTL, A. (1986). The fabrication of H^+ -selective liquid-membrane micro-electrodes for use in plant cells. J. Exp. Bot. 37, S. 1416-1428

FRANDSEN, G.; MÜLLER-URI, F.; NIELSEN, M.; MUNDY, J.; SKRIVER, K. (1996): Novel plant Ca^{2+} -binding Protein expressed in response to abscisic acid and osmotic stress. J. Biol. Chem. 271 (1), S. 343-348

FRIDOVICH, I.; HANDLER, P. (1961). Detection of free radicals generated during enzymic oxidations by initiation of sulfite oxidation. J. Biological Chemistry 236, S. 1836-1840.

FRY, S.C. (1982): Isodityrosine, a new cross-linking amino acid from plant cell wall glycoprotein. Biochem. J. 204, S. 449-455

GAFF, D.F.; CARR, D.J. (1961): The quantity of water in the cell wall and its significance. Austr. J. Biol. Sci. 14, S. 299-311

GALLIANO, H.; CABANÉ, M.; ECKERSKORN, C.; LOTTSPEICH, F.; SANDERMANN, H. JR.; ERNST, D. (1993): Molecular cloning sequence analysis and elicitor-/ ozone-induced accumulation of cinnamyl alcoholdehydrogenase from norway spruce (*Picea abies* L.). Plant Mol. Biol. 23, S. 145-156

GASPAR, T.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, T.H. (1982): Peroxidases 1970 - 1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève - Centre de Botanique, Genève

GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H. (1985): A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. Physiol. Plant 64, S. 418-423

GELINAS, D.O. (1973): Proposed model for the peroxidase-catalyzed oxidation of indole-acetic acid in the presence of the inhibitor ferulic acid. Plant Physiol. 51, S. 967-972

GEORGE, S.J.; KVARATSKHELIA, M.; DILWORTH, M.J.; THORNELEY, R.N. (1999): Reversible alkaline inactivation of lignin peroxidase involves the release of both the distal and proximal site calcium ions and bishistidine co-ordination of the haem. Biochem. J. 344, S. 237-244

GIARDI, M.T.; MASOJÍDEK, J.; GODDE, D. (1997): Effects of abiotic stresses on the turnover of the D1 reaction centre II protein. Physiol. Plant. 101, S. 635-642

- GOLDBERG, R.; IMBERTY, A.; LIBERMAN, M.; PRAT, R. (1986): Relationships between peroxidatic activities and cell wall plasticity. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPARD, TH. (eds.): Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva, Switzerland, S. 209 – 220
- GRIGNON, C.; SENTENAC, H. (1991): pH and ionic conditions in the apoplast. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 103-128
- GUDERIAN, R.; TIGNEY, D.T.; RABE, R. (1985): Effects of photochemical oxidants on plants. In: GUDERIAN, R. (ed.): Air pollution by photochemical oxidants. Formation, transport, control and effects on plants. Ecological Studies, Vol. 52, Part 2, S.127 - 296
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- GUEHL, J.M.; CLEMENT, A.; KAUSHAL, P.; AUSSENAC, G. (1993): Planting stress, water status and non-structural carbohydrate concentrations in Corsican pine seedlings. *Tree Physiology* 12, 173-183
- GUERN, J.; MATHIEU, Y.; PEAN, M.; PASQUIER, C.; BELOEIL, J.C., LALLEMAND, J.Y. (1986): Cytoplasmic pH regulation in *Acer pseudoplatanus* cells. I. A ³¹P-NMR description of acid load effects. *Plant Physiol.* 82, S. 840-845
- GYENES, M.; BULYCHEV, A.A.; KURELLE, A.G.; PEREZ ALVAREZ, P. (1981): Light-activated H⁺ transport into the vacuole of *Valonia ventricosa*. *J. Exp. Bot.* 32, S. 1273-1277
- HÄLLGREN, J.-E. (1978): Physiological and biochemical effects of sulfur dioxide on plants. In: NRIAGU, J.U. (ed.): Sulfur in the environment. Part II. Ecological Impacts. Wiley and Sons, New York, S. 163-209
- HANSTEIN, S.; FELLE, H.H. (1999): The influence of atmospheric NH₃ on the apoplastic pH of green leaves : a non-invasive approach with-pH-sensitive microelectrodes. *New Phytol.* 143, S. 333-338
- HAO, L.-M.; WANG, H.-L.; WEN, J.Q.; LIANG, H.-G. (1997): Effects of water stress on light-harvesting complex II (LHCII) and expression of a gene encoding LHCII in *Zea mays*. *J. Plant Physiol.* 149, S. 30-34
- HARTMANN, G.; NIENHAUS, F.; BUTIN, H. (1988): Farbatlas Waldschäden. Diagnose von Baumkrankheiten. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
- HARTUNG, W.; RADIN, J.W.; HENDRIX, D.L. (1988): Absciscic acid movement into the apoplastic solution of water stressed cotton leaves. Role of apoplastic pH. *Plant Physiol.* 86, S. 908-913
- HEATH, R.L. (1980): Initial events in injury to plants by air pollutants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, S. 395-431

HEATH, R.L.; TAYLOR, G.E.J. (1997): Physiological processes and plant responses to ozone exposure. In: R.L. HEATH, H. SANDERMANN, and A.R. WELLBURN, (eds.): Forest decline and ozone. A comparison of controlled chamber and field experiments. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 317-368

HEBER, U.; LAISK, A.; PFANZ, H.; LANGE, O.L. (1987): Wann ist SO₂ Nährstoff und wann Schadstoff? Ein Betrag zum Waldschadensproblem. AFZ 27/28/29, S. 700-705

HELDT, H.W. (1996): Pflanzenbiochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

HELDT, H.W.; WERDAN, K.; MILOVANCEV, M.; GELLER, G. (1973): Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylacoid space. Biochim. Biophys. Acta 314, S. 224-241

HEMPEL, W. (1983): Ursprüngliche und potentiell natürliche Vegetation in Sachsen. Dissertation, TU Dresden

HEPLER, P.K.; WAYNE, R.O. (1985): Calcium and plant development. Annu. Rev. Plant Physiol. 36, S. 397-439

HOCK, B (1995): Die grünen Pflanzen als photoautotrophe Organismen. In: HOCK, B.; ELSTNER, E.F. (Hrsg.): Schadwirkungen auf Pflanzen. 3. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 2-39

HOFFMANN, G. (1972): Wachstumsrhythmus der Wurzeln und Sproßachsen von Forstgehölzen. Flora 161, S. 303-319

HOFFMANN, B.; PLÄNKER, R.; MENGEL, K. (1992): Measurements of pH in the apoplast of sunflower leaves by means of fluorescence. Physiol. Plant. 84, S. 146-153

HÖRTENSTEINER, S. (1999): Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. Review. CMLS Cell. Mol. Life Sci. 56, S. 330-347

HU, C.; VAN HUYSTEE, R.B. (1989): Role of carbohydrate moieties in peanut peroxidases. Biochem. J. 263, S. 129-135

INSTITUT FÜR WALDBAU GÖTTINGEN (Hrsg.) (1992): Die einheimischen und die wichtigsten fremdländischen Baumarten. Univ. Göttingen

JÄGER, H.-J.; KLEIN, H. (1980): Biochemical and physiological effects of SO₂ on plants. Angew. Botanik 54, S. 337-348

JANKOWSKY, E. (1993): Charakterisierung apoplastidärer Peroxidasen in Nadeln von *Picea abies* (L.) Karst. mittels isoelektrischer Fokussierung als Beitrag zum Verständnis der

Kompartimentierung antioxidativer Reaktionen. Diplomarbeit TU Dresden, Institut für Pflanzen- und Holzchemie

JONES, D.K.; DALTON, D.A.; ROSELL, F.I.; LLOYD RAVEN, E. (1998): Class I heme peroxidases: Characterization of soybean ascorbate peroxidase. Arch. Biochem. Biophys. 360 (2), S. 173-178

KAISER, G.; MARTINOIA, E.; SCHRÖPPEL-MEIER, G.; HEBER, U. (1989): Active transport of sulfate into the vacuole of plant cells provides halotolerance and can detoxify SO₂. J. Plant Physiol. 133, S. 756-763

KAWANO, T.; MUTO, S. (2000): Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension. J. Exp. Bot. 51 (345), S. 685-693

KELLER, T. (1974): The use of peroxidase activity for monitoring and mapping air pollution areas. Eur. J. For. Path. 4, S. 11-19

KERSTIENS, G.; LENDZIAN, K.J. (1989): Interaction between ozone and plant cuticles. I. ozone deposition and permeability. New Phytol. 112, S. 13-19

KHAN, A.A.; MALHORTA, S.S. (1982): Peroxidase activity as an indicator of SO₂ injury in jack pine and white birch. Biochem. Physiol. Pflanzen 177, S. 643-650

KLEINIG, H.; SITTE, P. (1986): Zellbiologie. 2. Auflage Fischer Verlag Jena

KOKKINAKIS, D.M.; BROOKS, J.L. (1979): Hydrogen peroxide-mediated oxidation of indole-3-acetic acid by tomato peroxidase and molecular oxygen. Plant Physiol. 64, S. 220-223

KRAUSE, G.H.M.; HÖCKEL, F.-E. (1995): Long-term effects of ozone on *Fagus sylvatica* L. - an open-top chamber exposure study. Water, Air, Soil Pollut. 85, S. 1337-1342

KRONFUSS, G.; POLLE, A.; TAUSZ, M.; HAVRANEK, W.M.; WIESER, G. (1998): Effects of ozone and mild drought stress on gas exchange, antioxidants and chloroplast pigments in current-year needles of young norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. Trees 12, S. 482-489

LAGRIMINI, L.M.; ROTHSTEIN, S. (1987): Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. Plant Physiol. 84, S. 438-442

LAISK, A.; KULL, O. UND MOLDAU, H. (1989): Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. Plant Physiol. 90, S. 1163-1167

LANGEBARTELS, C.; ERNST, D.; HELLER, W.; LÜTZ, C.; PAYER, H.-D.; SANDERMANN, H. JR. (1997): Ozone responses of trees: results from controlled chamber exposures at the GSF Phytotron. In: HEATH, R.L.; H. SANDERMANN, H.; WELLBURN, A.R. (eds.): Forest decline and

ozone. A comparison of controlled chamber and field experiments. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, S. 163-200

LARCHER, W. (1994): Ökophysiologie der Pflanzen: Leben, Leistung und Streßbewältigung der Pflanzen in ihrer Umwelt. 5. Auflage, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

LAUKKANEN, H.; HÄGGMAN, H.; KONTUNEN-SOPPELA, S.; HOHTOLA, A. (1999): Tissue browning of in vitro cultures of scots pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiol. Plant.* 106, S. 337-343

LEGRAND, B.; GASPAR, T.; PENEL, C.; GREPPIN, H. (1976): Light and hormonal control of phenolic inhibitors of peroxidase in *Cichorium intybus* L.. *Plant Biochem. J.*, 3(2), S. 119-127

LOEWENSTEIN, N.J.; PALLARDY, S.G. (1998): Drought tolerance, xylem sap abscisic acid and stomatal conductance during soil drying: a comparison of young plants of four temperate deciduous angiosperms. *Tree Physiol.* 18, S. 421-430

LOPEZ-CARBONELL, M.; ALEGRE, L.; VAN ONCKELEN, H. (1994): Effects of water stress on cellular ultrastructure and on concentrations of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid in *Fatsia japonica* leaves. *Plant Growth Regul.* 14, S. 29-35

LÓPEZ-MILLÁN, A.F.; MORALES, F.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. (2000): Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiol.* 124, S. 873-884

LUWE, M.W.F.; TAKAHAMA, U.; HEBER, U. (1993): Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea*, L.) leaves. *Plant Physiol.* 101, S. 969-976

MÄDER, M. (1992): Compartmentation of peroxidase isoenzymes in Plant cells. In: PENEL, C.; GASPAR, H.; GREPPIN, H. (eds.): Plant peroxidases 1980 - 1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects. University of Geneva, Switzerland, S. 37-46

MÄDER, M.; BOPP, M.; MEYER, I. (1975): Lokalisation der Peroxidase-Isoenzyme in Protoplasten und Zellwänden von *Nicotiana tabacum* L.. *Planta* 122, S. 259-268

MÄDER, M.; MEYER, Y.; BOPP, M. (1976): Zellwandregeneration und Peroxidase-Isoenzym-Synthese isolierter Protoplasten von *Nicotiana tabacum* L.. *Planta* (Berl.) 129, S. 33-38

MÄDER, M.; NESSEL, A.; BOPP, M. (1977): Über die physiologische Bedeutung der Peroxidase-Isoenzymgruppen des Tabaks anhand einiger biochemischer Eigenschaften, II. pH-Optima, Michaelis-Konstanten, Maximale Oxidationsraten. *Z. Pflanzenphysiol.* 82, S. 247-260

MANES, M.; FEDERICO, R.; BRUNO, F. (1986): Peroxidase activity in *Nicotiana tabacum* L. leaves treated with simulated acid rain. *Phytopath. mediterr.* 25, S. 76-79

MANN, H.B.; WHITNEY, D.R. (1947): On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. In: SACHS, L. (1978): Angewandte Statistik. Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York

MATHIEU, Y.; GUERN, J.; PEAN, M.; PASQUIER, C.; BELOEIL, J.-C.; LALLEMAND, J.-Y. (1986): Cytoplasmic pH regulation in *Acer pseudoplatanus* cells. Plant Physiol. 82, S. 846-852.

MATYSSEK, R.; INNES, J.L. (1999): Ozone – a risk factor for trees and forests in europe? Water, Air, Soil Pollut. 116, S. 199-226

MATYSSEK, R.; PFANZ, H.; LOMSKY, B. (1995): Nutrition and the ecophysiology of spruce and birch under SO₂ and O₃ impact. In: EUROSILVA - Contribution to forest tree physiology. Dourdan (France), 7.-10. November 1994; Ed. INRA, Paris (Les Colloques, n°76), S. 119-140

MAURER, S.; MATYSSEK, R. (1997): Nutrition and the ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*). II. Carbon balance, water-use efficiency and nutritional status of the whole plant. Trees 12, S. 11-20

MCDUGALL, G.J. (1992): Plant peroxidases and cell differentiation. In: PENEL, C.; GASPAR, H.; GREPPIN, H. (Hrsg.): Plant peroxidases 1980 - 1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects. University of Geneva, Switzerland, S. 101-115

MCDUGALL, G.J.; MORRISON, I.M. (1995): Partial purification of peroxidase isozymes with altered substrate specificity from flax cell walls. J. Plant Physiol. 146, S. 393-397

MEHLHORN, H.; COTTAM, D.A.; LUCAS, P.W., WELLBURN, A.R. (1987): Induction of ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities by interaction of mixtures of air pollutants. Free Radical Res. Commun. 3, S. 193-197

MILES, P.W. (1999): Aphid saliva. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 74 (1), S. 41-85

MILES, P.W.; OERTLI, J.J. (1993): The significance of antioxidants in aphid-plant interactions: the redox hypothesis. Entomol. Exp. Appl. 67, S. 275-283

MOHR, H.; SCHOPFER, P. (1985) Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. 3.Auflage, korrigierter Nachdruck, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo

MOTTLEY, C.; MASON, P.R. (1988): Sulfate anion free radical formation by the peroxidation of (bi)sulfite and its reaction with hydroxyl radical scavengers. Arch. Biochem. Biophys. 267, S. 681-689

MOTTLEY, C.; TRICE, T.B.; MASON, P.R. (1982): Direct detection of the sulfur trioxide radical anion during the horseradish peroxidase-hydrogen peroxide oxidation of sulfite (Aqueous sulfur dioxide). Mol. Pharmacol. 22, S. 732-737

NAST, W. (1992): Zur Wirkung gasförmiger Luftschadstoffe auf enzymatische Reaktionen im Zusammenhang mit der Umwandlung und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies in den Assimilationsorganen von *Picea abies* (L.) Karst.. Dissertation TU Dresden, Institut für Pflanzen- und Holzchemie

NEBE, W.; VOGEL, M. (1998): Einleitung. In: Nebe, W., Roloff, A.; Vogel, M. (Hrsg.): Forstwissenschaftliche Beiträge Tharandt. Untersuchung von Waldökosystemen im Erzgebirge als Grundlage für einen ökologisch begründeten Waldumbau. Nr. 4; S. 3

NEBE, W.; ABIY, M.; HOFMANN, W.; WEISKE, A. (1998): Standorte der Experimentalflächen. In: Nebe, W., Roloff, A.; Vogel, M. (Hrsg.): Forstwissenschaftliche Beiträge Tharandt. Untersuchung von Waldökosystemen im Erzgebirge als Grundlage für einen ökologisch begründeten Waldumbau. Nr. 4; S. 19-27

NIEBOER, E.; MACFARLANE, J.D.; RICHARDSON, D.H.S. (1984): Modification of plant cell buffering capacities by gaseous air pollutants. In: KOZIOL, M.J.; WHATLEY, F.R.(eds.): Gaseous air pollutants and plant metabolism. Butterworths, London, S. 313-330

OJA, V.; LAISK, A.; HEBER, U. (1986): Light induced alkalization of the chloroplast stroma in vivo as estimated from the CO₂ capacity of intact sunflower leaves. Biochim. Biophys. Acta 849, S. 355-365

OJA, V.; SAVCHENKO, G.; JAKOB, B.; HEBER, U. (1999): pH and buffer capacities of apoplastic and cytoplasmic cell compartments in leaves. Planta 209, S. 239-249

OPPMANN, B. (1990): Entgiftung von Schwefeldioxid in der Zellwand von Blättern - Apoplastidäre Peroxidasereaktionen in unterschiedlich geschädigten Fichtennadeln verschiedener Waldstandorte. Diplomarbeit, Univ. Würzburg

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C.A. (1999): Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via octadecanoid pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, S. 6553-6557

OROZCO-CARDENAS, M.L.; NARVÁEZ-VÁSQUES, J.; RYAN, C.A. (2001): Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. Plant Cell 13, S. 179-191

OSSWALD, W.; ELSTNER, E.F. (1988): Die Wirt-Parasit-Beziehungen. Bakterien und Pilze als Parasiten. Vorgeformte und induzierte Abwehrmechanismen von Wirtspflanzen. In: HOCK, B.; ELSTNER, E.F. (Hrsg.): Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie. 2. Aufl., BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich

OTTO, L.-F. (1995): Waldschutzsituation 1994/95 in Sachsen. Allg. Forstz. 7, S.370-372

PÄÄKÖNEN, E.; SEPPÄNEN, S.; HOLOPAINEN, T.; KOKKO, H.; KÄRENLAMPI, S.; KÄRENLAMPI, L.; KANGASJÄRVI, J. (1998): Induction of genes for the stress proteins PR-10 and PAL in

relation to growth, visible injuries and stomatal conductance in birch (*Betula pendula*) clones exposed to ozone and/or drought. New Phytol. 138, S. 295-305

PEISER, G.D.; YANG, S.F. (1977): Chlorophyll destruction by the bisulfite-oxygen system. Plant Physiol. 60, S. 277-281

PEISKER, K. (1985): Trennung multipler Enzymformen durch isoelektrische Fokussierung in ultradünnen Polyacrylamidgelschichten auf Polyesterfolie. Biochem. Physiol. Pflanzen, 180, S. 407 – 441

PELL, E.J.; SCHLAGNHAUFER, C.D.; ARTECA, R.N. (1997): Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. Physiol. Plant. 100, S. 264-273

PENEL, C. (1976): Activité peroxydasique et développement chez *Spinacia oleracea*. Thèse de doctorat No. 1667, Univ. Geneve, 160 S. Zitiert in: GASPAR, T.; PENEL, C.; THORPE, T. und GREPPIN, T. (1982): Peroxidases 1970 - 1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève - Centre de Botanique,

PENEL, C. (1986): The role of calcium in the control of peroxidase activity. In: GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. (eds.): Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva, Switzerland, S.155 – 164

PENTTILÄ, A.; BOYLE, C.R.; SALIN, M.L. (1996): Active oxygen intermediates and chlorophyllin bleaching. Biochem. Biophys. Res. Commun. 226, S.135-139

PETERS, J.L.; CASTILLO, F.J. UND HEATH, R.L. (1988): Alteration of extracellular enzymes in pinto bean leaves upon exposure to air pollutants, ozone and sulfur dioxide. Plant Physiol. 89, S. 159-164

PFANZ, H. (1987): Aufnahme und Verteilung von Schwefeldioxid in pflanzlichen Zellen und Organellen. Auswirkungen auf den Stoffwechsel. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

PFANZ, H. (1993): Oxidation of IAA by extracellular peroxidases. In: WELINDER, K.G.; RASMUSSEN, S.K.; PENEL, C.; GREPPIN, H. (eds.): Plant peroxidases: Biochemistry and physiology. University of Geneva, Geneva, S. 169-174

PFANZ, H.; DIETZ, K.-J. (1987): A fluorescence method for the determination of the apoplastic proton concentration in intact leaf tissues. J. Plant Physiol. 129, S. 41-48

PFANZ, H.; HEBER, U. (1985): Protonenflüsse und zelluläre Pufferkapazitäten in Blättern bei SO₂-Belastung. Proc. of the int. Workshop on Physiol. and Biochem. of stressed plants; GSF-Bericht 44/ 85; S. 103-113

PFANZ, H.; HEBER, U. (1986): Buffer capacities of leaves, leaf cells and leaf cell organelles in relation to fluxes of potentially acidic gases. Plant Physiol. 81, S. 597-602

PFANZ, H.; HEBER, U. (1989): Determination of extra- and intracellular pH values in relation to the action of acidic gases on cells. In: LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. (eds.): Modern methods of plant analysis. Gases in plant and microbial cells. New Series 9, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, S. 322-341

PFANZ, H.; OPPMANN, B. (1991): The possible role of apoplastic peroxidases in detoxifying the air pollutant sulfur dioxide. In: LOBARZEWSKI, J.; GREPPIN, H.; PENEL, C.; GASPAR, T. (eds.): Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases. University of Geneva, Geneva, S. 401-417

PFANZ, H.; VOLLRATH, B. (1993): Photosynthese und Nährstoffgehalte von Buchen unterschiedlich stark SO₂-belasteter Standorte. Rundgespr. d. Kommission für Ökologie 5, S. 129-144

PFANZ, H.; MARTINOIA, E.; LANGE, O.L.; HEBER, U. (1987): Flux of SO₂ into leaf cells and cellular acidification by SO₂. Plant Physiol. 85, S. 928-933

PFANZ, H.; DIETZ, K.-J.; WEINERTH, I., AND OPPMANN, B. (1990): Detoxification of sulfur dioxide by apoplastic peroxidases. In: RENNENBERG, H. (ed.): Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants., SPB Academic Publishing bv, The Hague, S. 229-233

PITMAN, M.G.; LÜTTGE, U.; KRAMER, D.; BALL, E. (1974): Free space characteristics of barley leaf slices. Aust. J. Plant Physiol. 1, S. 65-75

POLLE, A.; CHAKRABARTI, K.; SCHÜRMANN, W.; RENNENBERG, H. (1990): Composition and properties of hydrogen peroxide. Decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of norway spruce (*Picea abies* L., Karst.). Plant Physiol. 94, S. 312-319

RANIERI, A.; D'URSO, G.; NALI, C.; LORENZINI, G.; SOLDATINI, G.F. (1996): Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. Physiol. Plant. 97, S. 381-387

RENNENBERG, H. (1984): The fate of excess sulfur in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35, S. 121-153.

REPKA, V.; FISCHEROVA, I.; CANIGOVA, K. (1996): Expression of cucumber stress-related anionic peroxidases during flower development or a cryptic infective process. Biol. Plant. 38 (4); S. 585-596

RIDOLFI, M.; FAUVEAU, M.L.; LABEL, P.; GARREC, J.P.; DREYER, E. (1996): Responses to water stress in an ABA-unresponsive hybrid poplar (*Populus koreana* x *trichocarpa* cv. Peace). I. Stomatal function. New Phytol 134, S. 445-454

RODONI, S.; SCHELLENBERG, M.; MATILE, P. (1998): Chlorophyll breakdown in senescing barley leaves as correlated with phaeophorbide a oxygenase activity. J. Plant Physiol. 152; S. 139-144

ROITTO, M.; AHONEN-JONNARTH, U.; LAMPPU, J.; HUTTUNEN, S. (1999): Apoplastic and total peroxidase activities in Scots pine needles at subarctic polluted sites. *Eur. J. For. Path.* 29, S. 399-410

RONEN, R.; GALUN, M. (1984): Pigment extraction from lichenes with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Environ. Exp. Bot.* 24 (3), S.239-245

ROS BARCELÒ, A.; MUÑOZ, R. (1992): Peroxidases: Their role in the control of plant cell growth. In: PENEL, C.; GASPAR, H.; GREPPIN, H. (eds.): *Plant peroxidases 1980 - 1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects.* University of Geneva, Switzerland, S. 71-89

ROS BARCELO, A.; MUNOZ, R.M; SABATER, F. (1987): Lupin peroxidases. I. Isolation and charakterization of cell wall-bound isoperoxidase activity. *Physiol. Plant.* 71, 448-454

ROS BARCELÓ, A.; PEDRENO, M.A.; MUNOZ, R.; SABATER, F. (1988): Lupin peroxidases. II. Binding of acidic isoperoxidases to cell walls. *Physiol. Plant.* 73, S. 238-244

ROSEMANN, D.; HELLER, W.; SANDERMANN, H. JR. (1991): Biochemical plant response to ozone. II. Induction of stilbene biosynthesis in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol.* 97, S. 1280-1286

ROTHE, M.; ROLOFF, A. (1998):Wasserhaushaltsuntersuchungen an Einzelbäumen der Fichte (*Picea abies* [L.] Karst.) unter dem Einfluß von Wassermangel. In: NEBE, W., ROLOFF, A; VOGEL, M. (Hrsg.): *Untersuchung von Waldökosystemen im Erzgebirge als Grundlage für einen ökologisch begründeten Waldumbau.* Forstwissenschaftliche Beiträge Tharandt 4, S. 143-149

SANCHEZ, M.; QUEIJEIRO, E.; REVILLA, G.; ZARRA, I. (1997): Changes in ascorbic acid levels in apoplastic fluid during growth of pine hypocotyls. Effect on peroxidase activities associated with cell walls. *Physiol. Plant.* 101, S. 815-820

SANDERMANN, H. JR. (1996): Ozone and plant health. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, S. 347-366

SANDERMANN, H.; SCHMITT, R.; HELLER, W.; ROSEMANN, D.; LANGEBARTELS, C. (1989): Ozone-induced early biochemical reaction in conifers. In: LONGHURST, J.W.S. (ed.): *Acid Deposition. Sources, effects and controls.* British Library Technical Communications, S. 243-254

SANDERMANN, H.; LANGEBARTELS, C.; HELLER, W. (1990): Ozonstreß bei Pflanzen. - Frühe und „Memory“-Effekte von Ozon bei Nadelbäumen. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 2, S. 14-15

SANDERMANN, H.; ERNST, D.; HELLER, W.; LANGEBARTELS, C. (1998): Ozone an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends Plant Sci.* 3, S. 47-50

SCHLEE, D. (1992): Ökologische Biochemie. 2. Auflage; Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, New York

SCHMIEDEN, U.; WILD, A. (1995): The contribution of ozone to forest decline. *Physiol. Plant.* 94, S. 371-378

SCHNEIDER, E.A.; WIGHTMAN, F. (1974): Metabolism of auxin in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, S. 487-513

SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; SANDERMANN, H. (1997): Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. *Physiol. Plant.* 100, S. 274-280

SCOTT, I.M.; DAT, J.F.; LOPEZ-DELGADO, H.; FOYER, C.H. (1999): Salicylic acid and hydrogen peroxide in abiotic stress signaling in plants. *Phyton (Austria)* 39, Special issue: „Plant Physiology“, S. 13-17

SHARMA, Y.K.; DAVIS, R. (1994): Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 105, S.1089-1096

ŠIRCELJ, H.; BATIČ, F.; ŠTAMPAR, F. (1999): Effects of drought stress on pigment, ascorbic acid and free amino acids content in leaves of two apple tree cultivars. *Phyton (Austria)* 39 (3), Special issue: „Plant Physiology“, S. 97-100

SMIRNOFF, N. (1993): The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *Transley Review No. 52, New Phytol.* 125, S. 27-58

SMITH, F.A.; FOX, A.D.(1975): The free space of Citrus leaf slices. *Aust. J. Plant Physiol.* 2, S. 441-446

SMITH, F.A.; RAVEN, J.A. (1979): Intracellular pH and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30, S. 289-311

SRIVASTAVA, O.P.; VAN HUYSTEE, R.B. (1977): An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase, and polyphenol oxidase from peanut cells. *Can. J. Bot.* 55, S. 2630-2635

STADLER, B.; SOLINGER, S.; MICHALZIK, B. (2000): Insect herbivores and the nutrient flow from the canopy to the soil in coniferous and deciduous forests. *Oecologia*, durch Springer-Verlag online publiziert, Dokument-Nr.: DOI 10.1007/s004420000514, 8 S.

STEFFENS, A. (1996): Ökofaunistische Untersuchungen an *Fagus sylvatica* (L.) auf immissionsbelasteten Standorten des Erzgebirges - ein Beitrag zur Charakterisierung des faunistischen Gefahrenpotentials für Jungbuchen im Rahmen des Waldumbaus. Diplomarbeit, TU Dresden, Institut für Waldbau und Forstschutz

STICHER, L.; PENEL, C.; GREPPIN, H. (1981): Calcium requirement for the secretion of peroxidases by plant cell suspensions. *J. Cell Sci.* 48, S. 345

STOCKWELL, W.R.; KRAMM, G.; SCHEEL, H.-E.; MOHNEN, V.A.; SEILER, W. (1997): Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United States. In: SANDERMANN, H.; WELLBURN, A.R.; HEATH, R.L. (eds): Forest decline and ozone. A comparison of controlled chamber and field experiments. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, S. 1-38

STRASBURGER, E (1998): Lehrbuch der Botanik. für Hochschulen. 34. Auflage, neubearbeitet von EHRENDORFER, F.; BRESINSKY, A.; SITTE, P.; ZIEGLER, H., Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York

STUDENT (1908): The probable error of a mean. Biometrika 6, S. 1-25

TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. (1992): Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. Plant Cell Physiol. 33, S. 379-387

TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. (1997): A peroxidase/ phenolics/ ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. Physiol. Plant. 101, S. 845-852

THOMPSON, D.S.; WILKINSON, S. BACON, M.A.; DAVIES, W.J. (1997): Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behaviour during water deficit. Physiol. Plant. 100, S. 303-313

VAN ASSCHE, F.; CARDINAELS, C.; CLIJSTERS, H. (1988): Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: dose –response relations in *Phaseolus vulgaris* L. treated with zinc and cadmium. Environ. Pollut. 52, S.103-115

VAN DEN BERG, B.M.; VAN HUYSTEE, R.B. (1984): Rapid isolation of plant peroxidase. Purification of peroxidase *a* from *Petunia*. Physiol. Plant. 60, S. 299-304

VAN HUYSTEE, R.B. (1987): Some molecular aspects of plant peroxidase biosynthetic studies. Annu. Rev. Plant Physiol. 38, S. 207-219

VAN HUYSTEE, R.B. (1990): Molecular aspects and biological functions of peanut peroxidases. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.E.; GRISHAM, M.B. (eds.): Peroxidases in chemistry and biology. CRC Press, Boca Raton, S. 155-170

VAN HUYSTEE, R.B.; ESNAULT, R. (1992): Structure and biosynthesis of peroxidase from peanut cells. In: PENEL, C.; GASPAR, H.; GREPPIN, H. (eds.): Plant peroxidases 1980 - 1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects. University of Geneva, Switzerland, S. 25-35

WALKER, D. (1987): The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. Robert Hill Institute, University of Sheffield, Oxygraphics Limited, Sheffield

WATANABE, T.; SAKAI, S. (1998): Effects of active oxygen species and methyl jasmonate on expression of the gene for a wound-inducible 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in winter squash (*Cucurbita maxima*). Planta 206, S. 570-576

WAUGHMAN, G.J.; BELLAMY, D.J. (1981): Movement of cations in some plant species prior to leaf senescence. *Ann. Bot.* 47, S. 141-145

WEISSENBOCK, G. (1976): Ligninbiosynthese und Lignifizierung pflanzlicher Zellwände. *Biologie in unserer Zeit* 5, 6. Jahrgang, S. 140-147

WELINDER, K.G. (1985): Plant Peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 151, S. 497-504

WELINDER, K.G. (1992): Plant peroxidases: Structure – function relationships. In: PENEL, C.; GASPAR, H.; GREPPIN, H. (eds.): *Plant peroxidases 1980 - 1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects.* University of Geneva, Switzerland, S. 1-24

WHITMORE, F.W. (1978): Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. *Phytochem.* 17, S. 421-425

YAMAZAKI, I.; MASON, H.S.; PIETTE, L. (1960): Identification, by electron paramagnetic resonance spectroscopy, of free radicals generated from substrates by peroxidase. *J. Biol. Chem.* 235, S. 2444-2449

ZHANG, X.; SCHMIDT, R.E. (1999): Antioxidant response to hormone-containing product in kentucky bluegrass subjected to drought. *Crop Sci.* 39, S. 545-551

ZIMMERMANN, F.; FIEBIG, J.; WIENHAUS, O. (1998): Immissionen und Depositionen. In: NEBE, W., ROLOFF, A.; VOGEL, M. (Hrsg.): *Forstwissenschaftliche Beiträge Tharandt. Untersuchung von Waldökosystemen im Erzgebirge als Grundlage für einen ökologisch begründeten Waldumbau.* Nr. 4; S. 39-49

ZIMMERMANN, F.; BÄUCKER, E.; FIEBIG, J.; WIENHAUS, O. (1999): Sulfatakkumulation und Kationenabscheidung in Mesophyllvakuolen von Fichten (*Picea abies* [L.] Karst.) im Osterzgebirge. *Forst und Holz* 6, S. 160-165

Danksagung

Hiermit möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. H. Pfanz für die Anregung zu diesem interessanten Thema, die Schaffung der Arbeitsbedingungen zur Durchführung der Untersuchungen und sein, trotz der großen räumlichen Entfernung, stetes Interesse am Fortgang der Arbeiten bedanken. Seine große Unterstützung bei der Beantragung meines Stipendiums trug maßgeblich dazu bei, daß diese Arbeit fertiggestellt werden konnte.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. J. Ludwig-Müller am Institut für Botanik der TU Dresden bedanken, die mich gleichfalls tatkräftig bei der Beantragung des Stipendiums unterstützte und mir auch bei fachlichen Fragen alle erdenkliche Unterstützung gewährte. Zudem danke ich ihr für die ausgesprochen freundliche Aufnahme am Institut für Botanik. Dank ihres großen persönlichen Engagements lassen sich derzeit Familie und Beruf vereinbaren.

Herrn Prof. Dr. A. Roloff, dem Leiter des Instituts für Forstbotanik und Forstzoologie der TU Dresden, danke ich herzlich für die Freiräume, die er mir ließ, die experimentellen Arbeiten an diesem Institut durchzuführen. Gleichzeitig möchte ich auch ihm für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeiten danken.

Beate Rothe danke ich für die „Einweihung“ in viele der hier angewendeten Methoden, für das wunderbare Arbeitsklima im Labor und dafür, daß sie zur Stelle war, wenn mich der Probenberg unter sich zu begraben drohte.

Bei Herrn Dipl. Forsting. E. Bäucker und Frau L. Stirl vom Institut für Forstnutzung und Forsttechnik der TU Dresden möchte ich mich für die exzellente Zusammenarbeit bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung der Blattproben bedanken. Ohne ihr hohes Maß an Erfahrungen bei der Probenbearbeitung und ihr freundliches Entgegenkommen wäre keines der abgebildeten REM-Bilder zustande gekommen.

Meiner ehemaligen Kollegin Frau Dr. Doris Krabel danke ich für viele interessante Diskussionen und für's Mutmachen, wenn mich eine „Durststrecke“ ereilte.

Die technische Ausführung der Begasung der Versuchspflanzen im Immissionsstreß-Versuch und die Bewässerung dieser Pflanzen lag in den Händen der Mitarbeiter des Immissionsökologischen Meßfeldes der TU Dresden (Leitung Prof. Dr. O. Wienhaus). Auch ihnen möchte ich an dieser Stelle danken.

Frau Dipl. Bioch. Anette Lehmann vom Institut für Pflanzenchemie und Holzchemie der TU Dresden opferte ihre Zeit für die Durchführung der Elektrophoresen und verhalf mir so zu vielen interessanten Ergebnissen. Auch ihr sei sehr herzlich gedankt.

Frau E. Reisberg vom Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie (Lehrstuhl Botanik I) der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg führte für mich die Analysen der Elementgehalte der Blätter aus. Ihr und dem damaligen Institutsleiter Herrn Prof. Dr. U. Heber danke ich, daß sie diese Analysen möglich machten.

Frau D. Berger vom Institut für Forstbotanik und Forstzoologie war mir bei der Beschaffung von Literatur sehr behilflich und übernahm das endlose Ausfüllen von Fernleihscheinen mit der Schreibmaschine. Hierfür danke ich ihr und auch dafür, daß sie für mich der Kaffeekanne immer noch eine volle Tasse entlockte.

Meinen ehemaligen Kollegen Michael Rothe, Alexander Solger, Jörg Ullrich und Dr. Steffen Schulze danke ich für das angenehme Arbeitsklima und für tatkräftige Hilfe, wenn es mehr als zweier Hände bedurfte.

Nicht zuletzt sei auch den Tischlern der TU Dresden in Tharandt gedankt, die sich alle erdenkliche Mühe gaben, meine sicherlich durchaus verbesserungswürdigen Skizzen und Vorgaben für die Gewächshäuser so gut wie möglich Realität werden zu lassen.

Meinem Mann Axel habe ich natürlich für vieles zu danken. Er ließ meine abendlichen Computerstunden über sich ergehen, übernahm den „Kinderdienst“, die Durchsicht des Manuskripts und vieles mehr. Ohne seine Hilfe wäre manches nicht möglich gewesen.

Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden teilweise im Rahmen des Verbundforschungsprojektes „Untersuchung von Waldökosystemen im Erzgebirge als Grundlage für einen ökologisch begründeten Waldumbau“ durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung unterstützt.